UNIVERSITÉ DE STRASBOURG FACULTÉ DE PHARMACIE

Année scolaire 1963-1964 N° 836

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA VANILLE ET DE LA VANILLINE SUR LE PLAN BROMATOLOGIQUE

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 28 avril 1964
devant la
FACULTÉ DE PHARMACIE DE STRASBOURG
en vue d'obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(Mention : PHARMACIE)
par

JEAN KELBER
Pharmacien
Diplômé de Sérologie
Diplômé d'Etudes Supérieures de Microbiologie
Diplômé d'Etudes Spéciales de Biochimie pharmaceutique et technique

Examinateurs de la Thèse :
MM. Michel HASSELMANN Professeur, Président
Paul CORDIER, Professeur } Juges
Pierre MÉTAIS, Professeur }

IMPRIMERIE ALSATIA COLMAR 1964

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG FACULTÉ DE PHARMACIE

Année scolaire 1963-1964 N° 836

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA VANILLE ET DE LA VANILLINE SUR LE PLAN BROMATOLOGIQUE

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 28 avril 1964
devant la
FACULTÉ DE PHARMACIE DE STRASBOURG
en vue d'obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(Mention : PHARMACIE)
par

JEAN KELBER

Pharmacien
Diplômé de Sérologie
Diplômé d'Etudes Supérieures de Microbiologie
Diplômé d'Etudes Spéciales de Biochimie pharmaceutique et technique

Examinateurs de la Thèse : MM. Michel HASSELMANN Professeur, Président
Paul CORDIER, Professeur
Pierre MÉTAIS, Professeur
Juges

IMPRIMERIE ALSATIA COLMAR 1964

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG – FACULTÉ DE PHARMACIE

MM. G. Gazet du Chatelier, Doyen
P. Duquénois, Doyen honoraire
J. Schreiber, Assesseur

Professeurs :

MM. Sartory R.	Bactériologie
Cordier P.	Pharmacie chimique
Duquénois P.	Matière médicale
Jaeger P.	Botanique
Gazet du Chatelier G. . .	Pharmacie galénique
Hasselmann M.	Chimie analytique
Schreiber J.	Chimie organique
Métais P.	Chimie Biologique
Laustriat G.	Physique

Professeurs honoraires :

MM. Lapp Ch., Ebel J.-P.

Maîtres de Conférences :

MM. Ledoux A.	Sciences naturelles
Malgras J.	Sciences naturelles
Lapp Ch. F.	Sciences physico-chimiques
Dirheimer G.	Sciences appliquées

Maître de Conférences honoraire :

M. Collard E.

Cours Complémentaires :

MM.	Sartory R.	Cryptogamie
	Duquénois P.	Hydrologie
	Gazet du Chatelier G. .	Pharmacodynamie
	Schreiber J.	Chimie générale
	Métais P.	Biochimie pharmac. et technique
	Laustriat G.	Eléments de Mathémat. Acoust., Physique Biologique appliquée
	Lavigne P.	Législation et Déontologie pharmaceutiques
	Malgras J.	Sérologie
	Lapp Ch. F.	Cristallographie
	Dirheimer G.	C.E. Supérieure de Chimie Biolog.
	Meyer G.	Comptabilité et Fiscalité pharm.
	Greiner G.	Patholgie de l'oreille et phonét.

Chefs de Travaux Pratiques :

Mme	Kristensen M.	Chimie pharmaceutique
	Ourisson N.	Histoire naturelle
MM.	Mathis C.	Chimie
	Stahl A.	Bactériologie et Parasitologie
	Romond Ch.	Bactériologie
	Wermuth C.	Chimie
	Jung L.	Physique
Mlle	Schaelderle D.	Chimie
MM.	Wittersheim H.	Physique

Secrétaire :

M. Clady Ch.

A mes Parents.

A tous ceux qui m'ont permis d'en arriver à ce point.

A tous ceux qui m'aideront à ne pas en rester là.

A mon Maître et Président de Thèse

Monsieur le Professeur MICHEL HASSELMANN

Professeur de Chimie analytique à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

A mes Examinateurs

Monsieur le Professeur PAUL CORDIER

Professeur de Pharmacie chimique à la Faculté de Pharmacie Strasbourg

Chevalier de la Légion d'Honneur

Monsieur le Professeur PIERRE MÉTAIS

Professeur de Chimie biologique à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

Hommage de profonde gratitude.

INTRODUCTION

Dans la famille des **Orchidacées,** parmi la centaine d'espèces du genre Vanilla, trois portent des fruits particulièrement odorants après dessication et sont cultivées pour cela; ce sont :

- **Vanilla planifolia Andrews** ou **V. fragrans (Salisbury) Ames**
- **Vanilla tahitensis Moore** ou vanille de Tahiti
- **Vanilla pompona Schiede** ou vanillon,

mais la première reste la plus appréciée dans le monde.

Spontanés en Amérique tropicale, les Vanilliers aux capsules aromatiques étaient déjà connus des Mexicains avant la découverte du Nouveau Monde. Les Espagnols, après en avoir appris des Aztèques l'usage comme aromatisant alimentaire, ont importé les fameuses « gousses » dans leur péninsule et les ont fait connaître, sous divers noms, en France et dans toute l'Europe dès le début du XVII^{e} siècle; le terme générique de Vanilla finit par prévaloir.

On a longtemps cultivé quelques plants de Vanilliers en serre dans nos pays tempérés. Puis, au début du XIX^{e} siècle, on a surtout diffusé **Vanilla planifolia Andrews;** ainsi, on l'a introduite à la Réunion, puis à Nossi-Bé, aux Comores, à Madagascar, à la Guadeloupe, à Java, à Tahiti, en Nouvelle-Calédonie, en Indochine, aux Seychelles, à l'île Maurice, à Porto-Rico et à Ceylan. Du point de vue climatique, le Vanillier exigeant une chaleur humide sans contrastes saisonniers accusés, s'est le mieux adapté dans les îles des régions tropicales. Mais sa culture n'a vraiment pris son essor que grâce à une meilleure connaissance de la plante et, surtout, grâce à la découverte en 1836, par le botaniste belge Morren, de la pollinisation artificielle. Dès lors, la fécondation ne dépendait plus de l'intervention des Mélipones (Hyménoptères) ou des oiseaux-mouches.

Vanilla planifolia Andrews (seule espèce que nous prendrons en considération dans ce travail, sauf indication contraire) se présente comme une liane herbacée robuste, de 5 à 15 m de long, fixée à son support par des racines aériennes. Sur la tige vert foncé, viennent s'insérer par un faux pétiole épais et court de grandes feuilles planes, charnues et glabres, mesurant de 8 à 25 cm de long sur 2 à 8 cm de large, sillonées de nombreuses nervures longitudinales. Les inflorescences simples, axillaires (très rarement terminales) comptent chacune de 6 à 15 et jusqu'à 30 fleurs. Celles-ci sont jaune verdâtre, aromatiques et d'aspect cireux; elles s'épanouissent pendant la nuit et se fanent en fin de journée : la floraison a donc duré 8 heures environ. L'ovaire, cylindrique et plus ou moins incurvé, est séparé des deux anthères par le rostellum qui s'oppose à la pollinisation directe.

La fécondation artificielle, poétiquement appelée « noces de la vanille », s'effectue selon la technique mise au point vers 1841 par un très jeune noir du nom d'Edmond Albius. Dans un premier temps, on abaisse et déchire le « labelle » à l'aide d'un bâtonnet; ainsi, la colonne et le gynostème se trouvent dégagés; avec le même bâtonnet, on relève le rostellum pour le placer sous l'étamine avant d'exercer une pression du doigt qui amène la masse pollinique au contact du stigmate. Dès le lendemain, l'ovaire se développe et, en 4 à 6 semaines, la taille du fruit est atteinte. Cependant, la maturité ne sera complète que neuf mois environ après la pollinisation. On s'arrange pour obtenir quatre à huit capsules par inflorescence, ce qui fera un total de cent à cent cinquante par liane.

En effet, ces capsules, appelées improprement « gousses », constituent la partie intéressante de la plante. Vertes quand elles sont mûres, elles brunissent en exhalant un parfum suave et se fendent spontanément pour laisser échapper une foule de petites graines noires. Mais, dans les pays de culture, on les cueille avant la déhiscence. On leur fait subir un traitement particulier destiné à développer leur arôme, avant de les expédier aux Etats-Unis et en Europe qui en sont les principaux consommateurs.

Dans ces pays où la vanille entre dans les boissons, l'expert, en face de produits de composition et de qualités très variables, doit pouvoir discerner n'importe quelle falsification.

Or les dix dernières années qui nous séparent de la volumineuse encyclopédie de Bouriquet [1]) ont apporté suffisamment de connaissances nouvelles sur la vanille pour qu'il nous ait paru utile, dans une **première partie** essentiellement **bibliographique,** de résumer à la fois ce qui était déjà acquis et ce qu'on a découvert depuis cette époque. Pour cela, nous suivrons le plan que voici :

Première partie : Etude bibliographique

I. - **La vanille :**

Ch. 1 : Préparation de la vanille.
Ch. 2 : Formation du parfum de la vanille.
Ch. 3 : Qualités et sortes commerciales de vanille.
Ch. 4 : Formes commerciales et utilisations de la vanille.
Ch. 5 : Composition chimique de la vanille préparée.
Ch. 6 : Principales fraudes.
Ch. 7 : Analyses diverses.

II. - **La vanilline :**

Ch. 1 : Propriétés physico-chimiques de la vanilline.
Ch. 2 : Propriétés physiologiques de la vanilline.
Ch. 3 : Isolement de la vanilline.
Ch. 4 : Méthodes de dosage de la vanilline.

Deuxième partie : Etude expérimentale

La première partie de notre travail doit permettre à l'expert de se faire une idée du caractère complexe de la vanille en tant que produit naturel. Les précisions particulières fournies sur la vanilline sont motivées par le fait que c'est le composant principal du parfum. Et comme la législation française porte plus pré-

[1]) Bouriquet (G.)
Le Vanillier et la Vanille dans le monde.
Encycl. biol. t. 46, Ed. Lechevalier, Paris (1954).

cisément sur ce composé, nous décrirons dans la partie expérimentale une méthode spécifique, rapide et sûre de dosage de la vanilline.

*
**

Avant d'aborder l'exposé de notre travail, qu'il nous soit permis d'exprimer à Monsieur le Professeur M. Hasselmann notre profonde reconnaissance pour avoir bien voulu nous accueillir dans son laboratoire, pour la confiance qu'il nous a témoignée en nous laissant une grande liberté d'action et pour les précieux conseils qu'il nous a prodigués durant nos recherches.

Nous tenons également à exprimer notre gratitude à Monsieur le Professeur P. Cordier pour avoir accepté de juger ce travail et pour la bienveillance qu'il n'a cessé de nous prodiguer. Nous voudrions de même remercier Monsieur le Professeur P. Métais pour l'intérêt qu'il a porté à notre travail et pour avoir bien voulu siéger dans notre jury de thèse.

Nos remerciements vont aussi à Monsieur le Doyen P. Duquénois et à Monsieur le Professeur P. Jaeger pour leurs précieuses indications, à Monsieur le Professeur G. Laustriat pour l'aimable accueil qu'il nous a toujours réservé et pour l'appareillage qu'il a si obligeamment mis à notre disposition, ainsi qu'à Monsieur L. Jung, Chef de Travaux, pour ses conseils amicaux.

Nous prions Monsieur M. Ney, Directeur du Laboratoire municipal de Metz, Monsieur Banzet, Monsieur Fernandopullé et Monsieur Rabémananjara, qui nous ont gracieusement fourni des échantillons de leur collection personnelle, de bien vouloir agréer nos sincères remerciements.

Nous ne saurions oublier tous nos amis qui nous ont traduit plusieurs articles en langues étrangères et tous ceux qui, au laboratoire, ont su créer et entretenir une agréable ambiance de franche camaraderie, ont suivi avec sympathie notre travail et nous ont aidé dans sa réalisation.

PREMIÈRE PARTIE

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LA VANILLE

Chapitre Premier

PRÉPARATION DE LA VANILLE

D'après Bouriquet (loc. cit. p. 13) à qui nous faisons de larges emprunts dans ce chapitre, la préparation de la vanille consiste à favoriser la formation du parfum, à donner au fruit un bel aspect, à éviter la déhiscence de la capsule et la rendre apte à bien se conserver. La quasi totalité de la vanille consommée dans le monde est produite de façon traditionnelle :

— par échaudage à la manière des préparateurs *réunionais*

— ou par le procédé *mexicain* au four.

On essaie cependant des améliorations dues à la technique moderne, mais aucune ne s'est encore généralisée.

Malgré des modalités pratiques différentes selon les régions, les traditions et les préparateurs, on retrouve toujours les phases suivantes :

1) mortification
2) étuvage
3) exposition au soleil alternant avec un séjour en caisse
4) séchage
5) conditionnement et triage.

1) Mortification

Son but est tout d'abord d'arrêter la maturation et d'empêcher la déhiscence du fruit. Mais la mortification doit aussi conserver

les enzymes des couches externes et favoriser leur diffusion vers les couches internes renfermant les principes dont la transformation donnera le parfum particulier.

Dans le *procédé réunionais* employé depuis 1851 à Madagascar, à La Réunion et aux Comores et que l'on attribue à Ernest Loupy, on *échaude* dans de l'eau à 60° C pendant environ deux minutes à deux minutes et demie, les gousses cueillies vertes entre juin et août. A Porto-Rico, on pratique plusieurs immersions vers 75° C, mais moins longtemps et deux jours de suite.

Le *procédé mexicain* fait appel à la chaleur d'un *four* : on dispose, en effet, les « gousses » emballées dans des nattes humectées d'eau à l'intérieur du « calorifico », sorte d'étuve en briques hermétiquement close, où l'on atteint 60° C en 12 heures environ; on maintient cette température de 18 à 24 heures.

Cette première phase est très délicate : le préparateur doit faire appel à toute son expérience pour déterminer le temps exact de traitement selon l'origine du fruit, son état de maturité et, surtout, selon le changement de couleur de la capsule, qui intervient durant cette opération.

2) Etuvage

Il a pour but de faire perdre à la vanille une partie de son humidité. Pour cela, on remplit entièrement des caisses de bois de « gousses » encore chaudes par suite des opérations précédentes. Ces caisses sont tapissées intérieurement de couvertures de laine à Madagascar, de toile de jute au Mexique, et on les entoure de nattes ou de couvertures. De cette façon, la chaleur se conserve le plus longtemps possible. Et les fruits, légèrement comprimés dans ces véritables « boîtes à suer » (selon l'expression mexicaine), y restent 12 à 24 heures en laissant écouler un liquide brunâtre.

3) Exposition au soleil alternant avec un séjour en caisse

Si le temps est beau, on expose les gousses, sorties des caisses et étalées en couches minces, aux rayons du soleil durant les heures les plus chaudes de la journée; elles y restent 2 à 3 heures. Sinon, on les maintient à l'abri 2 à 3 jours en couches épaisses

sur des claies de bois, mais en veillant à ce que le local soit bien aéré. Si, après ce temps, les conditions météorologiques ne sont pas redevenues favorables, ont traite les fruits par une source de chaleur artificielle ne dépassant pas 55° à 60° C. Que les gousses aient été réchauffées au soleil ou autrement, on les replace pour la nuit dans les caissons d'où s'écoule à nouveau un liquide noirâtre absorbé, au moins partiellement, par les enveloppes de tissu.

On répète alternativement l'exposition au soleil et le séjour en caisse pendant 4 à 15 jours selon le temps. Parallèlement, la vanille laisse exsuder un liquide de plus en plus visqueux, devient plus foncée, plus parfumée et plus souple. La *phase fermentaire* a commencé puisque l'arôme est apparu en même temps que la couleur a changé.

4) Séchage

Il se fait à l'ombre durant deux à trois mois à Madagascar sur des claies empilées et bien aérées. Au Mexique, on poursuit les expositions au soleil autant que possible.

5) Conditionnement

Il s'opère en malles closes ou en boîtes de fer blanc pendant trois à six mois. On enferme les fruits suffisamment secs ayant perdu à peu près 75 % de leur eau originelle. Pendant cette période se forme le givre et le parfum acquiert vraiment toute sa finesse et sa suavité. On vérifie très souvent l'absence de moisissures ou de fermentations parasites qui nuiraient à l'arôme.

Les vanilles restées saines sont triées et classées définitivement selon leur qualité et leur taille. Puis on les conditionne pour la vente.

La préparation de la vanille suit donc des règles traditionnelles où l'empirisme prédomine. Mais on a tenté une modernisation des techniques ancestrales.

Améliorations modernes dans la préparation traditionnelle

Une mortification partielle des tissus peut s'obtenir par le froid [1] [2], les radiations infra-rouges [3], l'alcool [4] ou des sacrifications longitudinales comme on les pratique à la Guadeloupe; cette dernière méthode, si elle nuit à l'aspect extérieur de la « gousse », donne, selon Vicente et Jones [5] des taux élevés de vanilline : 3,30 % contre 2,86 % par action du froid et 2,80 % par le procédé à l'eau chaude.

Pour accélérer le séchage, Cernudat et Loustalot [3] utilisent les rayons infra-rouges; mais on a aussi employé le chlorure de calcium comme agent deshydratant.

D'après Heckel [6], le temps de préparation de la vanille serait diminué par l'exposition des « gousses » à des vapeurs d'éther sulfurique ou de chloroforme; mais il faut se souvenir des dangers de l'utilisation industrielle de ces anesthésiques. L'irradiation par les rayons ultra-violets produiraient de même l'apparition très précoce du parfum caractéristique.

Malgré l'intérêt de certaines méthodes nouvelles et parfois même leurs avantages, les procédés réunionais et mexicain traditionnels restent pratiquement les seuls utilisés.

---

[1] Arana (F. E.)
Vanilla curing and its chemistry.
Fed. Exp. Stat. Bull. (oct. 1944), N° 42.

[2] Balls (A.K) Kevorkian (A.G.) Arana (F.E.)
Process for curing vanilla beans.
U.S. Patent N° 2, 274, 120.
U.S. Patent Office, Off. gaz, 535 : 802 (1942).

[3] Cernudat (C. F.) Loustalot (A.J.)
Infrared heat tried in different stages of vanilla curing.
Report of the Fed. Stat. in Puerto-Rico (1947), pp. 71 - 73.

[4] Procédé de Potier décrit par Chalot (Ch.) Bernard (U.)
Culture et préparation de la vanille.
Ed. Larose, Paris (1920).

[5] Vicente (G.C.) Jones (M.A.)
Vanilla curing involves non enzymatic as well as enzymatic changes.
Report of the Fed. Stat. in Puerto-Rico (1946), pp. 38 - 43.

[6] Heckel (Ed.)
De l'action du froid et des anesthésiques sur les feuilles de l'Angraecum fragrans Thom. (Iaham) et sur les gousses vertes de la vanille.
C. R. Ac. Sc. (1910), N° 151, pp. 128 - 131.

Chapitre 2

FORMATION DU PARFUM DE LA VANILLE

Au moment de la cueillette, les *fruits verts* de Vanilla planifolia Andrews sont *inodorants,* mais, avec la maturité ou une préparation spéciale, se développe un parfum agréable et suave dont la vanilline est responsable pour la plus grande part.

Le passage du vert au brun plus ou moins foncé ainsi que le développement progressif et tardif de l'arôme durant la préparation ont orienté dès l'origine les chercheurs vers une explication enzymatique.

Effectivement, dès 1901, LECOMTE [1]) reconnaît dans le fruit, mûr ou vert, préparé ou non, la présence d'une *oxydase vraie* fixant l'oxygène de l'air; on l'appellerait aujourd'hui *deshydrogénase,* car elle enlève l'hydrogène des phénols pour le fixer sur l'oxygène moléculaire. Le *manganèse* est présent également; or c'est un co-enzyme bien connu de nos jours.

D'autre part, LECOMTE a aussi découvert dans le suc du Vanillier une *hydrolase* capable d'agir sur l'amidon (en milieu alcalin seulement) et sur la coniférine ou coniféroside. Or, ce glucoside conduit, par hydrolyse, à l'alcool conifé rylique qui peut donner de la vanilline par oxydation. La *vanilline* étant la dominante du parfum de la vanille, l'auteur pense aussitôt à la filiation suivante :

$$\text{coniféroside} + H_2O \xrightarrow{\textit{hydrolase}} \text{alcool conifé rylique} + \text{glucose}$$

---

[1]) LECOMTE (H.)
Sur la formation du parfum de la vanille.
C. R. Ac. Sc. (1910), vol. 133, pp. 745 - 748.

$$\text{alcool coniférylique} + O_2 \xrightarrow{\textit{oxydase}} \text{vanilline}$$

Mais on n'a jamais pu isoler, ni le coniféroside, ni l'alcool coniférylique dans la vanille, ce qui rend l'hypothèse de LECOMTE très discutable, bien que la présence d'une oxydase et d'une hydrolase soit démontrée.

GORIS [2]) estime à quatre le nombre de glucosides originaux intervenant dans le parfum de la vanille :

1) le *vanilloside* (ou glucovanilline) qu'on trouve en grande quantité. Il a effectivement été isolé et donne bien de la *vanilline* et du glucose. Mais l'existence des trois suivants a été déduite de l'identification de leurs produits d'hydrolise;
2) le vanilloloside (ou alcool glucovanillique) dont l'hydrolyse supposée donnerait l'*alcool vanillique* qui, lui, a vraiment été caractérisé;
3) le glucoside de l'*aldéhyde protocatéchique*, aldélyde réellement présent;
4) un hétéroside donnant par dédoublement un *ester* à odeur fine qui contribue à donner un parfum plus suave et plus pénétrant que celui de la vanilline seule.

Les réactions de formation de la vanilline s'écriraient donc d'après GORIS :

$$\text{vanilloloside} + O_2 \xrightarrow{\textit{oxydase}} \text{vanilloside}$$

$$\text{vanilloside} + H_2O \xrightarrow{\textit{hydrolase}} \text{vanilline} + \text{glucose.}$$

Mais, par suite, JANOT [3]) a montré que le seul glucoside défini isolable est le *vanilloside*. Celui-ci existe donc préformé dans le fruit vert et ne provient ni du coniféroside, ni du vanilloloside. Il se trouve dans toute la capsule, mais principalement dans la

---

[2]) GORIS (A.)
Sur la composition des fruits verts de vanille et le mode de formation du parfum de la vanille.
C. R. Ac. Sc. (1924), vol. 179, pp. 70 - 72.

[3]) JANOT (M.M.) dans BOURIQUET (G.)
Encycl. biol. t. 46, Ed. Lechevalier, Paris (1954), ch. 13, p. 551.

partie centrale et dans l'extrémité florale opposée à la crosse : ces localisations correspondent bien à celles du givre naturel issu du dédoublement du vanilloside. Seulement, l'enzyme hydrolysant, qui doit être une β-glucosidase, n'a pas été identifié et n'apparaît que dans le fruit jaunissant et lors de la préparation.

Quoi qu'il en soit, VICENTE et JONES [4]) suggèrent que la vanilline une fois formée peut servir de produit intermédiaire dans l'élaboration de l'arôme, en particulier par la production de composés quinoniques à odeur différente.

BALLS et ARANA [5]) [6]) attribuent le changement de couleur au cours de l'étiolage et de la préparation à l'action d'un peroxyde et isolent effectivement une *peroxydase* capable d'oxyder la vanilline et le pyrogallol, mais ni le phloroglucinol, ni le résorcinol (ces deux derniers composés ont leur hydroxyle en méta). Ceci expliquerait le développement tardif de l'arôme non obligatoirement lié à une teneur élevée en vanilline.

Les *réactions enzymatiques majeures* sont dues, comme l'ont relevé JONES et VICENTE [7]), à tout un **système oxydasique** où interviennent oxydase, peroxydase, catalase, monophénoloxydase... L'action enzymatique prédomine durant les douze premiers jours de la préparation de la vanille, mais l'odeur se développe principalement après ce délai durant le séjour prolongé en caisse.

En plus de ces réactions diastasiques, une partie considérable du processus de traitement semble donc être de nature **non enzymatique.** Et, complication supplémentaire, le système oxydasique peut aussi intervenir sur les produits d'hydrolyse, en particulier la vanilline, pour donner des produits quinoniques.

Par ailleurs, les petites quantités d'*acide* et d'*alcool vanillique* pourraient provenir d'une réaction de type Cannizzaro sur la vanilline.

---

[4]) VICENTE (G. C.) JONES (M.A.)
Vanilla chemistry of vanilla processing.
Fed. Expt. Sta. Rpt. Puerto-Rico (1946), pp. 45 - 53.

[5]) BALLS (A.K.) ARANA (F. E.)
The curing of vanilla.
Ind. Eng. Chem. (1941), vol. 33, p. 1073.

[6]) —— ibid.
Determination and significance of phenols in vanilla extract.
L. of A.O.A.C. (1942), 24, 207 - 512.

[7]) JONES (M.A.) VICENTE (G.C.)
Criteria for testing vanilla in relation to killing and curing methods.
Journ. Agr. Res. (1949), vol. 78 pp. 425 - 434.

En résumé, tous les constituants du parfum de la vanille sont loin d'être connus et leur formation, qui est un phénomène complexe, n'est pas encore entièrement élucidée. Pourtant leur connaissance pourrait permettre d'améliorer les conditions de préparation et surtout d'obtenir des qualités reproductibles.

Chapitre 3

QUALITÉS ET SORTES COMMERCIALES DE VANILLES

Les principaux facteurs intervenant dans la qualité d'une vanille sont :

1) l'origine botanique
2) l'origine géographique
3) l'état de maturité
4) la préparation.

1) Origine botanique

C'est à juste titre que la législation française exige l'espèce *Vanilla planifolia Andrews,* car sa qualité dépasse en finesse la quinzaine de « gousses » odorantes du genre Vanilla que l'on connaît. Bien que très nettement prédominante sur le marché mondial, elle n'est pas la seule. Les pays d'origine cultivent et consomment d'autres espèces locales : ainsi de V. tahitensis, V. pompona et des espèces de Java ou d'Amérique du Sud.

2) Origine géographique

En dehors des différences botaniques, l'origine géographique influe également sur la qualité des vanilles préparées. Dans l'espèce V. planifolia Andrews, les plus appréciées sont, par ordre décroissant, les « gousses » en provenance du Mexique, puis le type « Bourbon » (qui comprend Madagascar), enfin celles de Tahiti.

Et à Madagascar même, les vanilleraies de la côte orientale sont plus estimées que celles des districts occidentaux; les vanilles des bords de mer ont un arôme moins fin que celles des collines. Bien que toute la production de Madagascar, des Comores et de La Réunion porte le nom de « vanille Bourbon », un spécialiste parvient à distinguer chaque sous-type.

3) Etat de maturité

La qualité dépend de l'état de maturité des capsules vertes : si la récolte est trop précoce, le parfum diminue notablement et les moisissures sont plus à craindre; si, au contraire, la récolte s'opère trop tard, la déhiscence intervient et le produit obtenu est déclassé quel que soit son arôme. Selon Jones et Vicente [1]), la meilleure qualité est fournie par des fruits ayant mûri tôt, mais suffisamment; dans ce cas, la taille n'intervient pas.

4) Préparation

Enfin, à des différences de préparation correspondent naturellement d'autres qualités; c'est pourquoi, il est toujours des experts pour affirmer la supériorité de la vanille du Mexique sur celle de Madagascar.

CRITÈRES DE QUALITÉ

Pour juger de la qualité d'une vanille, Frère [2]) indique de nombreux critères d'inégale valeur et dont certains sont loin d'être faciles à mesurer ou à définir. D'où la nécessité de spécialistes bien formés et très expérimentés.

---

[1]) Jones (M.A.) Vicente (G.C.)
Quality of cured vanilla in relation to some natural factors.
J. Agric. Res. (1949), *78*, N° 11, 445 - 450.

[2]) Frère (J.)
Encl. biol., t. 46, Ed. Lechevalier, Paris (1954), ch. 18.

1) Parfum

C'est le facteur dominant d'appréciation des vanilles et cependant les normes de qualité disent seulement : « *vanille de bon parfum* » ou « *de parfum franc* », car aucune définition n'est possible puisqu'il peut varier notablement. Par contre, les vanilles moisies, mitées, créosotées ou oxydées dégagent une odeur particulière et leur exportation est formellement interdite.

2) Longueur

C'est aussi un critère de qualité important. Les gousses les plus longues sont recherchées pour être vendues individuellement en tubes, car elles proviennent souvent d'un fruit bien nourri. Pour chaque type existe une *longueur minimale* (précisée par décret) en-dessous de laquelle les fruits ne peuvent être conditionnés en paquets, mais en vrac seulement : *12 cm* pour les « *Madagascar type Côte Est* »; *10 cm* pour les types « *Nossi-Bé* » et « *Comores* »; *6 inches* (soit 15 cm environ) pour la vanille « *Mexique* »; *5 inches* (soit 13 cm environ) pour celles de *Porto-Rico.*

3) Aspect extérieur

Il renseigne sur la préparation, le soin des manipulations et de la conservation. On note toutes les *cicatrices* (sauf la « *marque* » due à un poinçon aux initiales du propriétaire qui empêche ainsi les vols et les récoltes prématurées); les « *ragues* » sont des bourrelets de couleur brunâtre dus à une blessure de la gousse verte; les *morsures d'escargots* ont des bords curvilignes; un *Acarien* blanchâtre visible à l'œil nu, *Tyrolicus casei,* ronge la surface des fruits et provoque l'apparition d'une sorte de *poussière blanche* ainsi que d'une odeur particulière : c'est une vanille *mitée.*

Les vanilles *moisies* montrent des taches vertes ou jaune-vert lorsqu'elle sont atteintes par un *Penicillium* et un enduit rappelant la suie s'il s'agit d'un *Aspergillus.*

Le contact avec le fer blanc des boîtes d'emballage donne des vanilles *oxydées* à plaques noires, et, dans tous ces cas,

l'arôme est altéré. Les vanilles « *poiquées* » portent des cloques contenant un liquide. Cela proviendrait de l'ébouillantage trop énergique d'un épicarpe fragile. Ces cloques peuvent éclater et favoriser la pousse des moisissures.

Ce sont là les principaux défauts ou altérations des vanilles marchandes, toujours selon FRÈRE [2]).

4) Souplesse

Elle donne aussi une indication précise sur la qualité d'une « gousse ». On l'apprécie au toucher et ce n'est pas une des moindres difficultés du métier d'expert. Une « gousse » souple est généralement pleine, « onctueuse », luisante parce que riche en matières grasses et sans excès d'humidité.

Une vanille trop sèche, et parfois cassante, provient ou d'une récolte trop précoce ou d'un ébouillantage trop poussé lors de la préparation ou d'une conservation trop prolongée. Et puisque la souplesse dépend également de l'humidité, on peut prévoir si le produit préparé se conservera bien ou mal.

5) Couleur

Tout en étant moins importante que les caractères précédents, la couleur renseigne sur le degré de siccité de la vanille, et, par là, sur la durée probable de sa conservation. La couleur de fond varie du brun clair au brun foncé. Mais, en se desséchant, les gousses dites « *boisées* » montrent des stries longitudinales rougeâtres qui les déprécient un peu.

6) Givre naturel

C'est une cristallisation superficielle de *vanilline* ne se formant que si le taux de ce composé est assez élevé. Il apparaît au milieu et sur l'extrémité florale opposée à la crosse et est implanté *perpendiculairement à* l'épicarpe du fruit. On l'appelle « *givre farine* » quand les cristaux se présentent sous forme de paillettes; « *givre aiguille* » si ce sont des aiguilles soyeuses, longues et enchevêtrées; « *givre coton* » lorsqu'il est floconneux.

On a souvent recours à un givrage artificiel pour faire illusion sur le taux réel de vanilline. Même avec de la vanilline pure, ce procédé est interdit.

7) Goût

Ce devrait être un critère de qualité important puisque la vanille entre plutôt dans des préparations qui charment le palais que dans celles qui flattent l'odorat. Or, on tient plus compte du parfum, ce qui est une erreur d'après Frère [2]). Pour apprécier le goût d'une vanille indépendamment de son parfum, l'auteur pense qu'il vaut mieux plonger la « gousse » dans du lactose qui acquiert une saveur permettant de mesurer le degré de finesse mieux qu'avec un odorat bien exercé. Le lactose peut être remplacé par du saccharose ou du lait.

Vicente et Jones [3]) préconisent une méthode de dégustation à l'ice-cream alors que le Laboratoire de Normalisation de la Section technique d'Agriculture tropicale fait ses tests gustatifs avec une crème anglaise [4]).

CLASSEMENT COMMERCIAL DES VANILLES

Il est régi par des réglementations internationales et locales. Selon les pays producteurs, on distingue des « **types** » différents de *Vanilla planifolia Andrews*. Les principaux sont : le type « *Mexique* », le type « *Bourbon* » qui comprend La Réunion, l'archipel des Comores, Madagascar et ses dépendances, et les types « *Tahiti* », « *Seychelles* », « *Java* » et « *Porto-Rico* ». Et, en tenant compte des critères de qualité ci-dessus, on définit plusieurs **classes** ou **grades** à l'intérieur de chaque type.

---

[3]) Vicente (G.C.) Jones (M.A.)
A technic for testing vanilla by means of ice cream tried.
Fed. Expt. Stat. in Puerto-Rico, Mayaguez (mars 1945), p. 50.

[4]) Garros-Patin (J.) Hahn (J.) dans Bouriquet (G.)
Encycl. biol., t. 46, Ed. Lechevalier, Paris (1954), ch. 14, p. 604.

Type « Mexique »

Dans ce pays, la « selection de color » fournit cinq classes :

— « *Mexico Extra* » :
couleur foncée; beaucoup de corps; souple; aspect brillant dû à la haute teneur en huile; arôme doux.

— « *Mexico Superior* » :
un peu moins de corps; moins brillant, arôme suave.

— « *Mexico Buena* » :
corps maigre, peu flexible, peu brillant; stries légères, arôme suave.

— « *Mexico Mediana* » :
corps maigre; petites taches plus claires; sans flexibilité ni brillant; arôme suave.

— « *Mexico Ordinaria* » :
couleur claire avec taches plus foncées; peu de corps; tendance à la rigidité, arôme faible.

A l'intérieur de ces grades, on sépare les « gousses » **fendues.** Puis, on trie toutes les catégories selon leur *taille de 6 à 10 inches.* Les fruits qui ont moins de 6 inches portent le nom de « *cuta* » sur le marché et sont classés par ordre de qualité décroissante selon la couleur et le parfum en :

— *picadura buena*
— *picadura mediana*
— *picadura ordinaria.*

Type « Bourbon »

Il comprend des sous-types provenant de La Réunion, des Comores et de Madagascar « Côte Est » ou « Nossi-Bé ». Dans ces pays de l'Océan Indien, on sépare d'abord les « gousses » en deux grandes catégories : les « **entières** » et les « **fendues** ». Puis, on répartit ces deux sortes respectivement en cinq qualités :

— *extra* :
gousses onctueuses, grasses et souples, de préparation parfaite, de couleur brun chocolat; sans défauts; d'un parfum franc et suave;

— *première qualité :*

un peu moins grasses que les précédentes;

— *deuxième qualité :*

gousses plus fines pouvant porter quelques taches ou ragues d'importance moyenne; parfum franc;

— *troisième qualité :*

gousses assez maigres, boisées, pouvant présenter des taches ou ragues plus importantes; bon parfum;

— *quatrième qualité :*

comprenant toutes les vanilles « inférieures » dont le corps est sec et porte de nombreuses taches ou ragues;

Le mesurage consiste en un *classement par longueur* à l'intérieur de ces différents grades et précède l'empaquetage.

Type « Tahiti »

On le reconnaît à son odeur caractéristique de pipéronal ou héliotropine. Après triage, les vanilles sont classées en six qualités comportant chacune un sous-type « **fendues** » :

— *qualité extra :* (bande bleu foncé)

gousses saines, entières, de qualité supérieure; mesurant au moins 20 cm de long;

— *première qualité :* (bande rouge)

mêmes caractéristiques, mais longues de 18 à 20 cm;

— *deuxième qualité :* (bande blanche)

longueur : 14 cm au moins;

— *troisième qualité :* (bande jaune)

longueur inférieure à 14 cm;

— *quatrième qualité :* (bande verte)

vanilles de qualité inférieure; de toutes longueurs; fendues ou raguées;

— *cinquième qualité :* (bande noire)
vanilles avariées.

Les autres types sont peu cotés sur le marché international et sont consommés dans les pays d'origine.

Pour écouler les vanilles les moins bonnes, la vente s'effectue par lots comprenant un pourcentage à peu près fixe des diverses qualités. Ainsi pour un lot de « *50% première* » en provenance de Madagascar, on compte habituellement :

première qualité	: 50 %
deuxième qualité	: 20 à 30 %
troisième qualité	: 10 à 15 %
quatrième qualité	: 10 à 15 %

et pour un lot de « 2e *qualité à descendre* » :

deuxième qualité	: 30 à 50 %
troisième qualité	: 40 %
quatrième qualité	: 10 à 30 %

Cependant, la composition des lots n'est pas soumise à des lois, mais à des accords commerciaux tacites ou écrits, variables avec les pays producteurs et consommateurs.

Chapitre 4

FORMES COMMERCIALES ET UTILISATIONS DE LA VANILLE

En Pharmacie :

Conformément au Codex de 1949, on se sert exclusivement des « gousses » préparées de Vanilla planifolia Andrews pour fabriquer la *teinture* et l'*élixir de Garrus*.

Dans le commerce :

La vanille se présente sous forme de :

— gousse
— poudre
— sucre vanillé
— extraits de vanille.

1) La « *gousse* » préparée est la présentation la plus ancienne. Cette forme s'avère difficile à frauder, d'où la préférence des acheteurs; car on ne rencontre réunies en bottes et classées commercialement que les meilleures vanilles. Les moins bonnes sont le plus souvent réduites en poudre et soumises à l'extraction en vue de préparer des extraits alcooliques ou des oléorésines de vanille.

2) Les *poudres de vanille* sont obtenues en général par broyage des fruits préparés et desséchés : elles sont brunâtres

et montrent au microscope les caractères histologiques permettant de préciser l'espèce de Vanilla utilsée [1] [2]. D'après la circulaire du 7 avril 1950, on doit les appeler « *poudres de vanille pure* ».

Cependant la Compania Vanillera Mexicana S.A. prépare un « *Vanilla Fruit* » à partir des « gousses » bien mûres, et même fendues, qui sont broyées d'abord et traitées ensuite pour en développer le parfum. Celui-ci est moins fin, il est vrai; mais le produit obtenu, plus uniforme que les autres poudres, sert surtout à la fabrication des extraits [3].

En dehors de la préparation d'extraits, les poudres de vanille pure servent le plus souvent d'aromate dans l'industrie alimentaire qui en fait une grande consommation.

3) Les *sucres vanillés* sont de deux sortes :

a) Soit à base de poudre de vanille pure mélangée à du saccharose. Mais cette préparation a tendance à disparaître, car, la pulvérisation parfaite étant impossible, l'insoluble surnage sous forme de grains noirs : cela nuit à l'aspect.

b) Soit à base d'extrait sec de vanille pulvérisé qui se mélange parfaitement au saccharose; d'où l'extension actuelle de cette forme.

La circulaire du 7 avril 1950 précise qu'une « *poudre de vanille sucrée* » doit contenir du saccharose et au moins 25% de vanille, alors que le « *sucre vanillé* » doit en renfermer 10% au moins. De plus, elle prévoit aussi des « *sucres vanillineés* » à base de saccharose et de vanilline naturelle ou synthétique (0,7% au moins) ou d'éthylvanilline (0,2% au moins) mais pour ces derniers produits, l'étiquetage indique expressément « vanilliné » et « arôme artificiel ».

Tous ces produits sont employés uniquement dans l'alimentation.

---

[1] Stoll (S.) dans Bouriquet (G.)
Encycl. biol., t. 46, Ed. Lechevalier, Paris (1954), ch. 15, p. 616.

[2] Simony (R.)
Thèse en Pharmacie N° 636 (Strasbourg) : Etude morphologique, histologique et chimique des vanilles (1953).

[3] Bouriquet (G.)
Encycl. biol., t. 46, Ed. Lechevalier, Paris (1954), ch. 12, p. 519.

4) Les *extraits de vanille* sont préparés de façon à ce qu'ils contiennent presque tous les éléments odorants des vanilles. Cette forme connaît une grande vogue, surtout aux Etats-Unis, parce qu'elle est plus facile à conserver et à transporter. Les emplois en sont multiples dans l'industrie alimentaire et aussi en parfumerie.

a) Les extraits liquides sont des teintures ou des infusions dans l'alcool à 95° G.L. ou dans des alcools dilués de 30 à 70° G.L. On les appelle parfois « *essences de vanille* » [4]). La macération des « gousses » peut également se faire dans de l'eau contenant du sucre ou de la glycérine ou les deux. La vanilline étant plus soluble en milieu basique, on procède quelquefois à une « extraction alcaline ». Enfin, il est possible aussi de disperser une poudre de vanille dans un sirop de consistance assez visqueuse.

b) Les extraits semi-solides ou solides, appelés « *oléorésines* », sont obtenus en extrayant les « gousses » au soxhlet durant 15 heures par l'alcool à 60°-80° G.L., l'alcool isopropylique, l'acétone, le méthylal, le trichloréthylène, le tétrachlorure de carbone ou le benzène. Si l'oléorésine est destinée à la parfumerie, l'éther de pétrole convient également.

Certains auteurs, tels Naves et Mazuyer [5]), trouvent avantageux de procéder à une première extraction par le trichloréthylène ou le benzène et à une seconde par l'alcool ou l'acétone dilués. La concentration ultérieure de ces deux derniers solvants est très délicate, car, faite sans précautions, elle s'accompagne d'une forte perte de produits aromatiques [6]). Néanmoins, le solvant de choix est l'alcool à 50° G.L. et Maurel [7]) a montré qu'il

---

[4]) Lagneau (Ch.)
Note sur la composition des extraits de vanille.
Ann. Fals. Fraud. (1953), Nos 539 - 540, p. 432.

[5]) Naves (G.R.) Mazuyer (G.)
Les parfums naturels.

[6]) Gnadinger (C.B.)
Effect of vacuum distillation on vanilla extract.
Ed. Gauthiers - Villars, Paris (1939), p. 332.
Journ. Ind. Eng. Chem. (1927), *19*, 342 - 344.

[7]) Maurel (A.)
Contribution à l'étude de la vanille et de ses extraits : analyse-composition.
Ann. Fals. Fraud. (1954), Nos 547 - 548, 272 - 280.

fallait en plus des épuisements successifs, avec ou sans élévation de la température, pour obtenir des extraits renfermant tous les principes solubles.

La législation [8]) demande de préciser «*extrait de vanille à X%* » (X étant le poids de vanille mise en œuvre pour 100 ml de produit fini).

Les présentations commerciales de vanille sont donc nombreuses et variées. A part la « gousse », toutes ont subi des manipulations supplémentaires qui rendent les examens d'identification et de qualité plus délicats. Du fait même de ces opérations, on ne retrouve plus en général qu'une partie des composants de départ. Néanmoins, nous allons résumer la composition chimique de la vanille préparée.

---

[8]) Circulaire du 7 avril 1950.

Chapitre 5

COMPOSITION CHIMIQUE DE LA VANILLE PRÉPARÉE

Les travaux les plus récents donnent pour Vanilla planifolia *Andrews* des chiffres concordant avec ceux déjà cités par KÖNIG [1]) en 1878. Si on tient compte cependant des résultats donnés par d'autres auteurs sur des échantillons d'origines géographiques différentes et des précisions ultérieures apportées à la composition chimique de la vanille préparée, on peut les résumer dans le tableau suivant :

vanilline	1,5 à 2,9%
eau	13 à 40 %
cendres	3 à 7 % [2])
composés azotés	2,5 à 6 %
matières grasses et cires	4 à 15 %
glucides	14 à 19 %
sucres réducteurs	7 à 9 %
cellulose	8 à 20 %
huile essentielle	0,5 à 3,5%

La **teneur en eau** de la vanille préparée est bien moindre que celle de la vanille verte puisqu'elle passe de 70-80% à 20-45% environ; c'est d'ailleurs l'un des buts de la préparation et un facteur important de sa bonne conservation.

Dans les **cendres,** au maximum 7% de la substance sèche,

---

[1]) KÖNIG
Wieder die Nährungsfälscher.
Hannoversche Monatschr. (1878), p. 83.

[2]) Ce pourcentage est exprimé par rapport à la substance sèche, contrairement aux autres.

Pritzker et Jungkunz [3]) trouvent une faible partie insoluble dans l'acide chlorhydrique. La chaux et les carbonates prédominent dans ces cendres, mais de nombreux autres sels minéraux y sont présents.

Les **principes odorants** constituent les composés les plus importants en ce qui concerne la qualité d'une vanille. Mais si la *vanilline* — soit 1,5 à 3% — a le taux le plus élevé dans cette classe de produits, elle n'est pas la seule à intervenir dans l'odeur. En effet, Goris [4]) [5]), recherchant l'origine du parfum, a décelé après dédoublement des glucosides de la vanille verte, en plus de la vanilline, de l'*alcool vanillique*, de l'*aldéhyde protocatéchique* et son *acide* corresopndant, enfin un *ester* non identifié d'odeur suave et plus fine que celle de la vanilline.

Plus tard, Chovin, Stoll et Bouteville [6]) ont mis en évidence d'autres constituants normaux de Vanilla planifolia Andrews : l'*aldéhyde p-hydroxybenzoïque* et l'*acide* correspondant, qui est son dérivé de dégradation, de même que l'*acide vanillique* provient de la vanilline. Or tous ces composés sont odorants, quoique plus faiblement que la vanilline. D'après ces auteurs, le pourcentage de l'aldéhyde p-hydroxybenzoïque serait environ le dixième de la quantité de vanilline. De plus Lindemann [7]) signale une proportion de 0,5% de substances odorantes entraînables par la vapeur d'eau.

Quant à l'huile de vanille préparée, très différente [8]) de

---

[3]) Pritzker (J.) Junkunz (R.)
Analytisches über Vanillin und Vanillinzucker.
Chem. Zeitung (1928), *52*, 537.

[4]) Goris (A.)
Sur la composition des fruits verts de vanille et le mode de formation du parfum de la vanille.
C. R. Ac. Sc. (1924), vol. 179, pp. 70 - 72.

[5]) Goris (A.)
Formation du parfum de la vanille.
Confér. donnée à la Maison de la Chimie, le 16 mai 1945.
Industr. chim. de la Parfumerie (1947), vol. 2, pp. 4 - 12.

[6]) Chovin (P.) Stoll (S.) Bouteville (Y.)
Un composant naturel de l'arôme de la vanille : l'aldéhyde p-hydroxybenzoïque : extraction caractérisation.
Ann. Fals. Fraud. (1954), Nos 545 - 546, 187 - 191.

[7]) Lindemann (G.)
Vanille.
Riechst. u. Arom (1961), *11*, N° , 1 - 8.

[8]) Garros-Patin (J.) Hahn (J.) dans Bouriquet (G.)
Encycl. biol., t. 46, Ed. Lechevalier, Paris (1954), ch. 14, pp. 578 - 579.

l'huile de vanille verte d'odeur âcre et piquante, elle influe sur le parfum de deux façons : l'*huile essentielle* participe directement à l'arôme et l'*huile* dite *fixe* sert de fixateur au parfum. De nombreux autres constituants de la vanille jouent d'ailleurs ce rôle de **fixateurs du parfum :** ce sont toutes les matières grasses (mais surtout les cires), les gommes, les tanins et les sucres. Les *résines* interviennent de même comme substances odorantes et fixateurs du parfum. Ces fixateurs sont si puissants qu'un fruit de vanille conservé en herbier au Muséum depuis 1866 gardait encore son odeur caractéristique en 1951 [9]; sans eux, la vanilline, déjà sublimable à partir de 30° C, disparaîtrait rapidement.

Dans les espèces voisines, le parfum se trouve fortement modifié par d'autres composés aromatiques. Ainsi, Vanilla tahitensis Moore et V. pompona Schiede renferment du *pipéronal,* de l'*alcool* et de l'*aldéhyde anisiques;* ces produits ont une odeur plus âcre et moins fine; mais ils sont normalement absents chez V. planifolia, sauf à la Guadeloupe et à la Martinique selon Simony [10]).

Pour les **glucides** de l'espèce officinale, Pritzker et Jungkunz [11]) indiquent une proportion de *sucre interverti* de 14 à 17% de la matière sèche dont 2 à 5% environ de *saccharose.* A cela s'ajoutent une quantité importante de *cellulose* (8 à 20%) et des *mucilages.* Mais on note une totale *absence d'amidon.*

Dans les **lipides** se rangent les *cires* et une *huile* très acide comprenant environ 55% d'acides gras totaux; mais, chose singulière, les acides résiniques de l'huile de vanille préparée diffèrent profondément de ceux de l'huile de vanille verte...

A cela s'ajoutent d'autres **acides organiques :** Sullivan, Vœlker et Stahl [12]) en ont déterminés 16 à 18 dans divers extraits et

---

[9]) Garros-Patin (J.) Hahn (J.)
Ibid., p. 564.

[10]) Simony (R.)
Thèse de Pharmacie : Etude morphologique, histologique et chimique des vanilles.
Faculté de Pharmacie de Strasbourg (1953), N° 636.

[11]) Pritzker (J.) Junkunz (R.)
Analytisches über Vanillin und Vanillinzucker.
Chem. Zeitung (1928), *52,* 537.

[12]) Sullivan (J.H.) Voelker (W.A.) Stahl (W.H.)
Analysis of vanilla extracts. I. Organic acid determination.
J. of A.O.A.C. (1960), *43,* N° 3, 601 - 605.

ont caractérisé l'*acide malique*. Plus tard, ces mêmes auteurs [13]) ont identifié, après hydrolyse chlorhydrique des extraits, 14 **acides aminés** par chromatographie sur papier; par la méthode de Spakmann, Stein et Moore [14]), ils en détectent 19 en quantités variables selon les origines botanique et géographique de la vanille examinée : ainsi, l'*acide γ-aminobutyrique* est nettement plus abondant dans le type « Mexique » que dans le type « Bourbon » ou dans V. tahitensis Moore.

Il faut signaler qu'il reste dans la vanille les **enzymes,** surtout ceux qui sont intervenus dans la formation du parfum [15]), mais leur activité est très réduite.

En bref, Pritzker et Jungkunz [11]) considèrent comme fondamentaux les chiffres suivants pour juger une vanille préparée :

vanilline	minimum 2%
eau	maximum 35%
cendres	maximum 7 % [16])
amidon	totalement absent

Il n'en reste pas moins que ces données sont très insuffisantes pour se faire une idée exacte de la qualité d'une vanille.

---

[13]) Stahl (W.H.) Voelker (W.A.) Sullivan (J.H.)
Analysis of vanilla extracts. IV. Amino acid determination.
J. of A.O.A.C. (1962), *45*, N° 1, 108 - 113.

[14]) Spakman (D.) Stein (W.H.) Moore (S.)
Anal. Chem. (1958), *30*, 1190.

[15]) Voir chapitre 2 sur la formation du parfum de la vanille, p. 23.

[16]) Pourcentage de la substance sèche.

Chapitre 6

PRINCIPALES FRAUDES

Connaissant les principaux composants de la vanille préparée, l'expert doit également savoir ce qu'il ne doit jamais y trouver. Les différentes fraudes peuvent porter sur :

1) la vanille en « gousse »
2) les produits vanillés ou vanillinés
3) le remplacement de la vanilline.

1) Fraudes portant sur la vanille en « gousse »

Les tromperies portant sur l'extérieur de la « gousse » sont assez peu fréquentes, car trop faciles à mettre en évidence par des spécialistes. La plupart du temps, elles consistent à essayer de masquer une « gousse » déjà extraite pour lui redonner une valeur marchande indue ou à rendre un aspect luisant à une capsule trop sèche; dans ce but, on pratique l'*huilage* : on enduit le fruit d'huile, souvent de l'*huile de paraffine*, parfois de *baume du Pérou;* ce dernier lui communique de plus une odeur agréable, différente cependant de celle de la vanille naturelle.

Il arrive aussi qu'on simule le givre de la vanille en la saupoudrant de cristaux d'*acide benzoïque* ou d'un autre composé odorant; même si on utilise de la *vanilline* pure, ce procédé est formellement interdit.

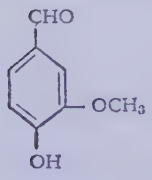
Plus fréquemment, on trempe la vanille dans une solution *antiseptique* à base d'acide benzoïque ou salicylique ou de formol très dilué, ou même de bichlorure de mercure (tableau A) ! Cela permet de conserver des « gousses » à très forte teneur d'eau et

donc d'un poids plus grand [1]); mais ces pratiques sont très dangereuses pour le consommateur quand il s'agit de produits toxiques.

2) Fraudes portant sur les produits vanillés ou vanillinés

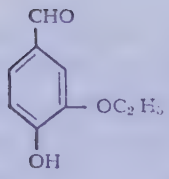
Le plus souvent, elles consistent en une dilution excessive. Ainsi, dans les poudres, on utilise surtout des *sucres :* saccharose, glucose, lactose; dans les extraits liquides, on rajoute du *solvant* d'extraction ou du *glycérol* ou du *propylène-glycol.*

3) Remplacement de la vanilline



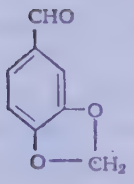
Vanilline

On substitue à la vanille des composés chimiques de formule plus ou moins voisine :



Ethylvanilline (ou bourbonal ou vanillal)

— de pouvoir aromatique 4 fois supérieur à celui de la vanilline [2]).



Pipéronal (ou héliotropine)

— a une odeur moins suave;

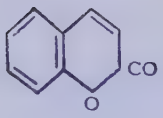
— naturellement présent dans Vanilla tahitensis et V. pompona;

— absent dans V. planifolia.

---

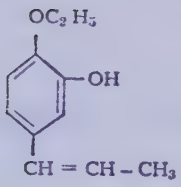
[1]) Garros-Patin (J.) Hahn (J.) dans Bouriquet (G.) Encycl. biol., t. 46, Ed. Lechevalier, Paris (1954), ch. 14, p. 605.

[2]) L'éthylvanilline est autorisée dans certains pays étrangers comme arôme artificiel et en France seulement dans les sucres dits vanillinés.



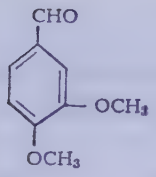
Coumarine :

— son arôme est celui du foin séché.



Vanitrope (ou 5-propénylguaethol
ou 1-éthoxy 2-hydroxy 4-propénylbenzène)

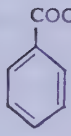
— a une odeur moins fine, mais environ 20 fois plus forte que celle de la vanilline.



Méthylvanilline (ou aldéhyde vératrique)

— son odeur est très voisine de la vanilline mais un peu moins forte.

Acide benzoïque :

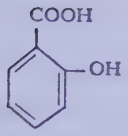


— son parfum aromatique est différent de celui de la vanilline;

— n'a ni fonction aldéhydique ni fonction phénolique rappelant la vanilline;

— sert d'antiseptique pour stabiliser les « gousses ».

Acide salicylique :



— est utilisé pour sa fonction phénolique, mais n'a pas de groupement aldéhydique;

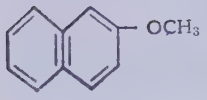
— sert d'antiseptique pour stabiliser une « gousse » à teneur en eau excessive.

Aldéhyde anisique :

— est naturellement présent en petite quantité dans Vanilla tahitensis, de même que l'acide et l'alcool correspondants;

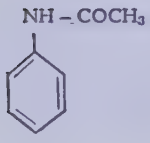
— est absent dans V. planifolia;

— a une fonction aldéhydique, mais pas de groupement phénolique libre.



Néroline (ou β-naphtylméthyléther)

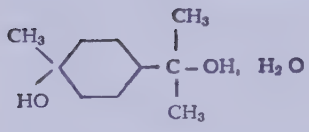
— est assez éloignée de la vanilline et pour l'odeur et pour la composition chimique.



Acétanilide :

— cristallise très différement de la vanilline.

Hydrate de terpine



— médicament expectorant qui constitue une fraude très grossière.

Chapitre 7

ANALYSES DIVERSES

Dans ce chapitre, nous résumons les analyses et recherches de tous genres que pratiquent les experts sur les produits vanillés ou vanillinés pour se faire une idée de leur composition, de leur qualité et de leur conformité aux normes établies par la législation française. Un premier groupe d'examens ne peut s'effectuer que sur la vanille. Dans un second groupe, nous indiquons les méthodes d'analyse des extraits, étant entendu que certaines sont communes aux poudres, oléorésines et autres produits vanillés ou vanillinés sans modification technique appréciable.

A) EXAMENS PROPRES AUX VANILLES

Examen histologique

Il fournit de précieux renseignements sur l'origine botanique et même géographique d'une vanille. Nous empruntons au travail de Simony [1]) les caractères différentiels les plus importants.

Tout d'abord, à l'œil nu, la *coupe* de Vanilla planifolia Andrews montre une section subtrigone, alors que celle de V. tahitensis Moore est plutôt elliptique et celle de V. pompona Schiede, beaucoup plus large, présente une forme sublosangique.

L'*épicarge* de cette dernière espèce se distingue par la présence en certains endroits de cellules lignifiées. On observe

---

[1]) Simony (R.)
Etude morphologique, histologique et chimique des vanilles.
Thèse de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg (1953), N° 636.

également de nombreuses invaginations de l'épicarpe appelées « cryptes ». Celles-ci seraient absentes dans les sortes de vanilles africaines; mais on les a trouvées chez V. planifolia de la Martinique et de la Guadeloupe seulement. Certaines vanilles de Tahiti, à défaut de « cryptes », possèdent des plis non subérifiés de l'épicarpe.

Dans le *mésocarpe*, on a découvert, sauf chez V. pompona. des cellules lignifiées à ornements divers : ponctuations ovales, épaississements en forme de spirale ou de réticule. Ces cellules ornementées sont alignées en files plus longues que larges dans V. planifolia du Mexique et groupées en îlot de 3 à 4 cellules dans les vanilles originaires de Madagascar. V. tahitensis ne possède que de rares cellules à ponctuation ovalaire et pas de cellules à épaississement spiralé ou réticulé. Les faisceaux libéro-ligneux, au nombre d'une vingtaine, sont répartis assez régulièrement dans le mésocarpe.

L'*endocarpe* porte de nombreux poils unicellulaires sécrétant des goutelettes d'aspect oléagineux. Chez V. planifolia, les poils sont fins, filiformes, à tête légèrement renflée; quelques-uns sont plus trapus dans les vanilles mexicaines et malgaches. Mais ceux de V. pompona se terminent toujours par une sphère renflée. Très longs, au contraire, les poils de V. tahitensis sont disposés typiquement en trois franges.

La *cavité centrale* qui renferme les nombreuses *graines* dans une masse balsamique et mucilagineuse n'offre pas de différence remarquable entre espèces, pas plus que la forme ou l'aspect réticulé des graines elles-mêmes.

Teneur en eau

Sur un échantillon moyen de « gousses » coupées ou broyées, on dose l'humidité, soit par *dessication à l'étuve* à 70° C jusqu'à poids constant, soit par *entraînement au xylène*, selon une technique dont Garros-Patin et Hahn [2]) ont donné le détail. On ne doit jamais trouver une teneur en eau supérieure à 45 % et une bonne conservation de la vanille est assurée pour des chiffres voisins de 30 %.

---

[2]) Garros-Patin (J.) Hahn (J.) dans Bouriquet (G.) Encycl. biol., t. 46, Ed. Lechevalier, Paris (1954), pp. 568 - 570.

B) EXAMENS PORTANT SUR LES EXTRAITS

L'analyse d'un extrait de vanille est chose très délicate et nombreux sont les examens qu'on peut lui faire subir à cause de la grande complexité de ce milieu. Nous citerons les déterminations les plus courantes (dont on trouvera les modes opératoires détaillés dans BOURIQUET [3]), sauf avis contraire) ainsi que les recherches des fraudes les plus fréquentes.

Extrait sec à 100°

Il se pratique comme pour d'autres produits alimentaires liquides. Mais, les chiffres trouvés dans notre cas varient selon les solvants d'extraction. Pour un extrait éthéré, par exemple, ils oscillent entre 10 et 15 % du poids de la vanille sèche.

Cendres

Après évaporation de 10 ml d'extrait dans une capsule de platine, on calcine au rouge et on pèse après refroidissement : on obtient ainsi les *cendres totales.*

On verse alors sur ces cendres 40 ml d'eau chaude que l'on fait bouillir quelques minutes. On filtre alors sur un filtre sans cendres et on amène le filtrat à 100 ml. On calcine le filtre et on pèse après refroidissement les *cendres insolubles dans l'eau.* Les résultats moyens en g pour 100 ml sont :

— cendres totales	0,25 à 0,35
— cendres insolubles dans l'eau	0,035 à 0,080

Par différence entre les deux chiffres précédents, on calcule les *cendres solubles dans l'eau.*

Sur le filtrat refroidi, on détermine l'*alcalinité des cendres solubles* par titrage acidimétrique avec de l'acide chlorhydrique

---

[3]) BOURIQUET (G.)
Le vanillier et la vanille dans le monde.
Encycl. biol., t. 46, Ed. Lechevalier, Paris (1954), pp. 559 - 615.

0,1 N en présence de méthylorange. L'*alcalinité des cendres insolubles* est titrée par retour après addition dans la capsule d'un excès d'acide chlorhydrique 0,1 N porté à ébullition : on verse la soude 0,1 N et on note le virage du méthylorange. Dans chaque cas, l'alcalinité s'exprime par le nombre de ml d'acide 0,1 N pour 1 g d'échantillon :

— alcalinité des cendres solubles dans l'eau 30 à 40
— alcalinité des cendres insolubles dans l'eau 7 à 18

Acidité totale

Pour cette mesure, on dilue l'extrait avec de l'eau afin de mieux apprécier le virage de la phénolphtaléine lors de la neutralisation par la soude O,1 N. Il faut, en général, de 40 à 50 ml d'alcali 0,1 N pour 100 ml d'extrait et on estime que 8 à 15 ml sont dus à l'acidité de la vanilline.

Indice de plomb

Les acides organiques et minéraux contenus dans les extraits de vanille donnent un précipité avec l'acétate de plomb, contrairement aux solutions de vanilline colorées pour imiter la vanille. On détermine l'indice de plomb, soit à l'état de sulfate dont on multiplie le poids trouvé par 13,66, soit à l'état de chromate dont on multiplie le poids par 12,82. Pour un extrait pur de vanille standard, cet indice ne saurait être inférieur à 0,40.

Actuellement, on n'accorde plus grande importance à cet examen et Broderick [4]) affirme même son inutilité pour apprécier la qualité des extraits.

Tests gustatifs

Entrant surtout dans des produits alimentaires, la vanille, les sucres vanillés ou les extraits de vanille sont naturellement

---

[4]) Broderick (J.J.)
Lead number and vanilla quality.
Coffee and Tea inds. (1954), 77, N° 3, 57 - 58.

jugés sur leurs propriétés gustatives. Bien que plus subjectives, ces appréciations sont très importantes.

Vicente et Jones [5]) utilisent la *méthode à l'ice-cream*. La formule de la crème est :

crème	1 l
lait	4 l
sucre	800 g
gomme adragante	7,5 g

Chaque test se fait sur une portion de 100 g de cette crème à laquelle on ajoute la quantité correspondante du produit à essayer; puis, on met au frigidaire. La dégustation se fait quand la crème est glacée.

Le Laboratoire de Normalisation de la Section d'Agriculture Tropicale prend pour support une *crème anglaise* de composition suivante [6]) :

lait	1 l
jaunes d'œufs	6
sucre	150 g

La cuisson au B.M. évite l'ébullition. On incorpore le produit à expertiser dans des parts de 100 g ou de 100 ml qu'on laisse refroidir et qu'on porte au frigidaire. La dégustation doit se faire avant formation de glace.

Dosage du glucose et du saccharose :

Il se fait après défécation par le réactif de Courtonne selon la méthode de Fehling ou de Bertrand.

Dosage de l'alcool

On distille l'alcool de 25 ml d'échantillon et on détermine la densité à 15° C du distillat amené à un volume connu. Les tables

---

[5]) Vicente (G.C.) Jones (M.A.)
A technic for testing vanilla by means of ice cream tried.
Fed. Expt. Stat. in Puerto-Rico, Mayaguez (mars 1945), p. 50.

[6]) Garros-Patin (J.) Hahn (J.) dans Bouriquet (G.)
Encycl. biol., t. 46, Ed. Lechevalier, Paris (1954), ch. 14, p. 604.

de degrés alcooliques donnent le pourcentage d'alcool correspondant.

Dosage du propylène-glycol et du glycérol

Tous deux sont des solvants possibles pour extraits de vanille. Ils augmentent notablement l'extrait sec à 100° qui apparaît comme ayant une consistance humide, alors qu'on est pratiquement à poids constant. Bruening [7]) propose d'opérer une codistillation avec l'heptane, puis un dosage par oxydation periodique. Si le glycérol est présent, on dose en milieu alcalin le formol libéré par oxydation periodique et on déduit cette quantité de periodate consommée.

Dosage des acides organiques

Horst et McGlumphy [8]) signalent plusieurs méthodes donnant des renseignements plus précis que l'indice de plomb sur la quantité et l'identité des acides organiques contenus dans les extraits de vanille. Burchfield et coll. [9]) utilisent une colonne échangeuse d'ions après élimination des gommes, résines, composés carbonylés et acides aminés : les résultats sont exacts, mais la méthode trop longue et trop compliquée. Sullivan et coll. [10]) ont essayé de simplifier la méthode en fixant des acides organiques sur la colonne sans élimination préalable des autres substances; ils éluent par l'acide formique. Way [11]) précipite par l'acétate neutre de plomb ces mêmes acides organiques qui sont ensuite libérés par l'acide sulfhydrique et séparés par chromatographie ascendante sur papier. Cette dernière technique est la plus simple et

---

[7]) Bruening (C.F.)
The determination of propylene-glycol in vanilla extracts.
J. of A.O.A.C. (1950), *33*, 103 - 109.

[8]) Horst (P.) McGlumphy (C.F.)
Recherche des falsifications dans les extraits de vanille.
Ann. Fals. Exp. Chim. (1962), Nos 643 - 645, 264 - 273.

[9]) Burchfiel (H.P.) Prill (E.A.) Fisher (D.)
Proc. Flavoring Extract Manufacturers Association (1957), *48*, 60.

[10]) Sullivan (J.H.) Voelker (W.A.) Stahl (W.H.)
Analysis of vanilla extracts. I. Organic acid determination.
J. of A.O.A.C. (1960), *43*, No 3, 601 - 105.

[11]) Way (R.) cité par Horst et McGlumphy : cf. supra.

la plus attrayante, bien que la révélation par les colorants ne soit pas encore tout à fait satisfaisante.

Acides aminés

Prill et coll. [12]) éliminent ici les gommes, résines et composés carbonylés, puis fixent les acides aminés sur colonne. Après élution, ils effectuent une chromatographie sur papier à deux dimensions et identifient les différents acides aminés par spectrophotométrie.

La méthode de Stahl et coll. [13]) [14]) semble plus simple parce qu'elle consiste à chromatographier directement l'extrait sur colonne selon la technique de Spackman, Stein et Moore et à recueillir des fractions qu'on colore par la ninhydrine. La courbe d'élution est caractéristique. La vanille « Bourbon » se distingue des vanilles du Mexique et de Tahiti grâce au taux d'*acide γ-aminobutyrique*. On peut égalemnet chromatographier l'éluat sur papier pour identifier les acides aminés.

Résines

Pour Horst et McGlumphy [8]), qui relèvent plusieurs méthodes d'analyse qualitative et quantitative des résines, celle de Fitelson [15]) est actuellement la meilleure. En général, la technique qualitative par chromatographie sur papier se montre suffisante.

Couleur caramel

Après défécation à l'acétate de plomb, le filtrat présente normalement une couleur jaune clair. Le caramel lui confère

---

[12]) Prill (E.A.) Porter (C.A.) Staples (R.C.) Burchfield (H.P.)
J. of. A.O.A.C. (1960), *43*, 96.

[13]) Stahl (W.H.) Voelker (W.A.) Sullivan (J.H.)
Proc. Flavoring Extract Manufacturers Association (1961), *52*, 39.

[14]) —— ibid.
Analysis of vanilla extracts. IV. Amino-acid determination.
J. of A.O.A.C. (1962), *45*, N° 1, 108 - 113.

[15]) Fitelson (J.)
J. of A.O.A.C. (1960), *43*, 600.

une couleur jaune-brun à brun foncé. HALLORY et LOVE [16]) et le recueil officiel des « Methods » [17]) aux Etats-Unis proposent même sa détermination quantitative.

Recherche de l'éthylvanilline

Autorisée en France dans les sucres dits vanillinés et interdits dans les autres aliments, mais largement utilisée à l'étranger, l'éthylvanilline constitue la fraude la plus fréquente parce que son pouvoir aromatique est quatre fois plus fort que celui de la vanilline. Mais la structure chimique très voisine de ces deux composés rendait difficile la mise en évidence de la falsification avant l'emploi des méthodes chromatographiques.

On se basait sur l'insolubilité à chaud de la phénylhydrazone de l'éthylvanilline en milieu acétique; dans les mêmes conditions, la vanilline met 24 heures à se déposer. On savait également que l'hydrazone de l'éthylvanilline est jaune citron et celle de la vanilline rouge-orange [18]); mais aux rayons ultra-violets, seule cette dernière montre une fluorescence à reflets bleutés.

CHENOWETH [19]) après défécation et extraction éthérée des extraits de vanille avait noté une différence de coloration quand il opérait de la manière suivante : une goutte d'une solution de peroxyde d'hydrogène à 3 % ajoutée à la solution chlorhydrique du résidu d'extraction, donne toujours une couleur jaune qui vire au rouge avec dépôt d'un précipité bleuâtre; si on agite ce mélange avec du benzène, celui-ci devient violet en présence d'éthylvanilline après 20 minutes de séjour au bain-marie à 55° C; le benzène reste jaune dans les autres cas. D'après l'auteur, cette coloration violette serait spécifique de l'éthylvanilline et non influencée par les produits naturellement présents dans la vanille, ni par la coumarine, ni par le pipéronal.

---

[16]) HALLORY (G.E.) LOVE (R.F.)
Quantitative determination of caramel in vanilla extracts.
Industr. Engen. Chem., anal. Ed. (1945), *17*, 631 - 637.

[17]) *Methods of Analysis of A.O.A.C.*, 9e éd. (1960), N° 19 047.

[18]) DINGEMANS (J.J.)
Het onderzoek van vanille suiker.
Chem. Weekblad (27 déc. 1931), p. 694.

[19]) CHENOWETH (H.W.)
Qualitative test for ethylvanillin in vanilla extract.
Ind. Eng. Chem. (1940), *12*, N° 2, 98 - 99.

Janovsky et Filandro [20]) utilisent une autre réaction colorée en mélangeant 2 ml d'une solution à 1 % de l'inconnu avec 0,5 ml de soude N et 0,25 ml d'une solution alcoolique fraîche à 1 % de p-aminophénol : l'éthylvanilline présente une coloration pourpre et la vanilline une faible teinte jaune ou olivâtre.

Mais actuellement, on fait surtout appel à la *chromatographie* sur papier ou en couche mince pour mettre en évidence l'éthylvanilline. Pratiquement, tous les auteurs [21]) ont composé leurs solvants pour la séparer de la vanilline. Pour révéler, il est bon d'utiliser ou la benzidine chlorhydrique ou le sulfate d'hydrazine.

Recherche de la coumarine

On a proposé des méthodes pondérale [22]) colorimétrique [23]) et fluorescimétrique [24]) de la coumarine. Mais sa détection suffit pour affirmer la fraude d'un produit vanillé. Pour cela, on l'extrayait par l'éther et sur le résidu d'évaporation de l'éther, on pratiquait la réaction de Leach : la coumarine en solution aqueuse donne avec une goutte de solution iodo-iodurée un précipité brun qui devient vert foncé.

On préfère actuellement la chromatographie : pour la révélation, on met à profit la fluorescense verte due à la transformation de la coumarine en acide coumarique lors de la pulvérisation de soude ou d'une solution de carbonate de sodium sur le chromatogramme.

Recherche du pipéronal et de l'aldéhyde anisique

Caractéristiques de Vanilla tahitensis et V. pompona, ces composés trouvés dans un produit vanillé permet d'affirmer que la fabrication n'a pas été faite uniquement avec V. planifolia d'où ils sont normalement absents [25]). Leur révélation sur le chromato-

---

[20]) Janovsky (H.L.) Filandro (A.S.)
Detection of ethylvanillin in vanilla extract.
J. Agr. Food Chem. (1953), *1*, N° 12, 783.

[21]) Voir p. 71 notre chapitre sur l'isolement de la vanilline.

[22]) Winton (A.L.) Bailey (E.M.)
Journ. Am. Chem. Soc. (1899), *21;*
(1905), *27.*

[22]) Ensminger (L.G.)
J. of A.O.A.C. (1951), *34*, 73.

[24]) Jakobey (I.)
Növenytermeles (1961), *10*, N° 1, 59 - 66.

gramme s'effectuent en même temps que celle de la vanilline par l'un des réactifs de la fonction aldéhydique.

Recherche du vanitrope

Si l'odeur du vanitrope (ou propénylguaethol) est bien moins fine que celle de la vanilline, elle est, en contre-partie, une vingtaine de fois plus forte; d'où son emploi èventuel comme fraude. On sait le doser par colorimétrie [26]) [27]) et par spectrophotométrie [28]). Mais le plus souvent, on se contente de le mettre en évidence sur les chromatogrammes par un réactif des phénols.

On a tenté d'effectuer *toutes les recherches qualitatives,* que nous mentionnons ci-dessus, *en une seule fois par chromatographie. Sur papier,* la méthode de Horst et McGlumphy [29]) est la plus complète. *En couche mince,* la technique que nous indiquerons plus loin pour le dosage de la vanilline est aussi valable pour les essais qualitatifs. Ce dernier procédé nous paraît préférable parce que beaucoup plus rapide et aussi plus sensible.

Il va sans dire que le dosage le plus important, et d'ailleurs exigé par la législation qui en impose le taux minimum, concerne la vanilline. Et puisque c'est aussi le principal constituant aromatique de la vanille, nous lui consacrons la seconde partie de notre travail bibliographique pour résumer les très nombreuses études qui l'ont eu pour objet.

---

[25]) Simony signale cependant dans sa thèse sur « l'Etude morphologique, histologique et chimique des Vanilles » (cf. supra), que les fruits de V. planifolia originaires de la Guadeloupe et de la Martinique renferment du pipéronal et de l'aldéhyde anisique et sont, par suite, moins appréciés que les types « Bourbon » ou « Mexique ».

[26]) Maurel (A.)
Contribution à l'étude du vanitrope.
C. R. Acad. Agr. Fr. (1956), *42,* N° 5, 251 - 253.

[27]) Roberts (R.M.)
Colorimetric determination of propenylguaethol in imitation vanilla.
J. of A.O.A.C. (1953), *36,* N° 4, 1119 - 1123.

[28]) Englis (D.T.) Wollermann (L.A.)
Analytical characteristics of propenylguaethol and vanillin.
Food Res. (1955), *20,* N° 6, 567 - 574.

[29]) Horst (P.) McGlumphy (J.H.)
Recherche des falsifications dans les extraits de vanille.
Ann. Fals. Exp. Chim. (1962), N^{os} 643 - 645, p. 271.

II. LA VANILLINE

Chapitre Premier

PROPRIÉTÉS PHYSICO - CHIMIQUES DE LA VANILLINE

Du point de vue de ses **propriétés physiques,** la vanilline se présente sous la forme d'une *poudre blanche à odeur de vanille.* Selon VIOLANDA [1]), il peut se faire **deux cristallisations naturelles** sur le fruit : l'une sous forme d'*aiguilles* (F = 77-79°C), l'autre sous forme de *plaquettes tétragonales* (F = 81-82°C). On n'obtient que des aiguilles par évaporation de solutions alcooliques ou éthérées et seules les aiguilles agissent sur la lumière polarisée.

La littérature indique toujours **81 - 82° C** comme **point de fusion** de la vanilline, mais celle-ci **se sublime** sans décomposition à partir de 30° C et de plus en plus rapidement à mesure que la température augmente.

La **solubilité** de la vanilline est bonne dans l'alcool, l'éther, le chloroforme, le tétrachlorure de carbone, les huiles grasses et essentielles, l'acide acétique glacial, le glycérol, la pyridine, les hydroxydes alcalins, mais l'est beaucoup moins dans l'eau et dans l'éther de pétrole. CARTWRIGHT [2]) parvient à dissoudre :

0,86 g de vanilline dans 100 g d'eau à 15° C
1,03 g de vanilline dans 100 g d'eau à 20° C
1,24 g de vanilline dans 100 g d'eau à 25° C
3,30 g de vanilline dans 100 g d'eau à 50° C

Mais **en solution,** la vanilline n'est **pas stable** longtemps si on ne prend pas certaines précautions de concentration ou de pH :

---

[1]) VIOLANDA (A.T.)
The natural occurence of two crystalline forms of vanillin.
Philippine Agr. (1954), *37*, 507 - 511.

[2]) CARTWRIGHT (L.C.)
Vanilla-like synthetics. Solubility and volatility of propenylguaethol, bourbonal, vanillin and coumarin.
J. agr. Food Chem. (1953), *1*, N° 4, 312 - 314.

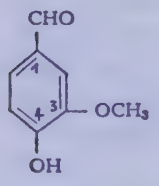
d'après LAGNEAU [3]), une solution hydro-alcoolique à 1 g/l est stable pendant plus d'un an, et, pour ENGLIS et WOLLERMANN [4]) une solution à pH 10,7 est stable environ six mois, même pour la spectrophotométrie.

La vanilline n'est **pas entraînable par la vapeur d'eau.**

Dans l'eau, elle se comporte comme un **acide faible,** titrable par la soude en présence de phénolphtaléine ou de thymolphtaléine.

D'autre part, elle **absorbe** en plusieurs régions du spectre : ainsi MAUREL et LALEMENT [5]) trouvent en solution dans l'alcool à 95° G. L. deux maximums d'absorption dans l'*ultra-violet* à 312 et 278 mμ et deux minimums à 296 et 248 mμ. Mais ENGLIS et WOLLERMANN [4]) ont montré que le pH influe sur le maximum d'absorption dans l'ultra-violet et indiquent trois points isobestiques bien définis à 238, 259 et 316 mμ; d'après eux le pK calculé se situe à 7,3. En solution dans l'isopropanol, SCROCCO et LIBERTI [6]) détectent dans *l'infra-rouge* un maximum à 1 664 cm^{-1}. Quant à BRIGGS et coll [7]), après l'étude des spectres dans l'infra-rouge d'une centaine de composés, ils donnent la bande à 2 850 cm^{-1} comme caractéristique du groupement méthoxyle.

Du point de vue de ses **propriétés chimiques,** la **vanilline** se caractérise surtout par sa fonction **aldéhyde** et par sa fonction **phénol.** Grâce à cette dernière, elle réagit avec les hydroxydes alcalins en donnant des phénates solubles dans l'eau. Avec le bisulfite de sodium, sa fonction aldéhydique est engagée dans une combinaison bisulfitique stable, soluble dans l'eau, insoluble dans l'éther et hydrolysable par les acides dilués.



[3]) LAGNEAU (Ch.)
Note sur la composition des extraits de vanille.
Ann. Fals. Fraud. (1953), Nos 539 - 540, 434.

[4]) ENGLIS (D.T.) WOLLERMANN (L.A.)
Significance of pH in determination of vanillin by ultra-violet absorption.
Ann. Chem. (1957), 29, 1151 - 1153.

[5]) MAUREL (A.) LALEMENT (S.)
Etude des falsifications des extraits de vanille.
Ann. Fals. Fraud. (1952), Nos 523 - 524, 262.

[6]) SCROCCO (M.) LIBERTI (A.)
Frequency structure relations in some ketones and aldehydes.
Ricerca sci. (1954), *24*, 1687 - 1694 (rés. angl.).

[7]) BRIGGS (L.H.) COLEBROOK (L.D.) FALES (H.M.) WILDMANN (W.C.)
Infrared absorption spectra methylenedioxy and aryl ether groups.
Anal. Chem. (1957), *29*, 904 - 911.

La vanilline est **oxydable** et **réductible.** A l'air libre et humide, on assiste à son oxydation lente en acide vanillique. Rosenthaler [8]) a étudié la réduction par la vanilline de plusieurs réactifs classiques parmi lesquels : les réactifs de Fehling, de Nylander et de Nessler, l'oxyde d'argent, le bleu de méthylène alcalin. La réduction du réactif phosphomolybdotungstique de Folin et Denis est connue et utilisée depuis longtemps. Le mélange sulfochromique produit, selon l'intensité de l'oxydation, une polymérisation en 5-5 déhydrodivanilline ou une décomposition avec libération de gaz carbonique : ceci résulte du travail de Traynard et Robert [9]). Stumpf et Rumpf [10]) procèdent à l'oxydation periodique et utilisent cette réaction pour doser la vanilline. Son *oxydation enzymatique* est également possible, non seulement dans la « gousse » de vanille, mais même in vitro par la xantine-oxydase du lait dont Kuramoto et coll. [11]) apprécient ainsi l'activité dans un lait non chauffé.

La fonction aldéhyde peut donner la réaction de Cannizzaro, surtout en présence d'argent métallique finement divisé en guise de catalyseur : par *oxydo-réduction,* il se forme de l'acide et de l'alcool vanilliques.

Il n'est donc pas surprenant que la vanilline, à cause de sa grande oxydabilité, soit un excellent *anti-oxydant.*

Enfin la vanilline, par l'une ou l'autre de ses fonctions, donne de très nombreuses **réactions colorées,** dont voici les principales :

— avec l'acide sulfurique concentré : coloration jaune;
— en solution aqueuse avec l'acide nitrique : coloration jaune de picrate de méthyle;
— avec le perchlorure de fer dilué : coloration bleu-vert;

---

[8]) Rosenthaler (L.)
Reduction reactions of aldehydes.
Pharm. Acta Helv. (1954), *29,* 23 - 26.

[9]) Traynard (P.) Robert (A.)
Oxydation de nombreux dérivés substitués de l'hydroxybenzaldéhyde.
Compt. rend. (1957), *244,* 204 - 205.

[10]) Stumpf (W.) Rumpf (G.)
Synthesis and reactions of guaiacylglycerol.
Ann. (1956), *599,* 51 - 60.

[11]) Kuramoto (S.) Jeness (R.) Coulter (S.T.)
Oxidation of vanillin by unheated milk.
J. Dairy Sci. (1957), *40,* 187 - 191.

— avec la 4-aminoantipyrine [12]) en présence d'ammoniaque et de ferricyanure de potassium : coloration rose [13]);

— avec l'acide sulfanilique diazoté : coloration jaune [14]);

— avec le réactif nitromercuriel de Millon après ébullition : coloration pourpre stable [15]);

— avec le réactif phospho-molybdotungstique de Folin et Denis : coloration bleue [16]) non spécifique;

— avec le réactif de Schiff, on constate une recoloration d'autant plus sensible qu'on utilise une formule particulière de réactif comprenant une fuchsine basique en l'absence d'alcali [17]);

— avec la benzidine chlorhydrique : coloration jaune à orangé commune à d'autres aldéhydes et cétones, mais fluorescence jaune-vert;

— avec le sulfate d'hydrazine en solution chlorhydrique : préciptation rouge orange [18]);

— avec les cétones aliphatiques (surtout méthylées) et les aldéhydes en milieu fortement alcalin : coloration jaune, orangée ou rouge [19]);

N.B. L'acétone donne la coloration la plus forte et peut être recherchée dans les urines grâce à cette réaction en utilisant le mode opératoire de Frommer;

---

[12]) C'est un réactif officiel des phénols dans les eaux (J.O. 20 juin 1953).

[13]) Ayroud (A.M.) Martin-Borret (O.) Jacquemin (H.)
Recherches sur l'existence de produits phénoliques dans les lessives résiduaires.
Assoc. tech. ind. papetière, Bull. (1955), 45 - 49.

[14]) Bardinskaya (M.S.)
Color tests for liguin.
Doklady Akad. Nauk, S.S.S.R. (1950), *73*, 345 - 348.

[15]) Thorpe (W.V.) Williams (R.T.)
J. Chem. Soc. (1937), p. 494.

[16]) Folin (O.) Denis (W.)
A new colorimetric method of the determination of vanillin in vanilla extracts.
Journ. Ind. Eng. Chem. (1912), *4*, 670.

[17]) Giral (J.) Hanhausen (E.) Carrasco (C.)
Ciencia (1955), *15*, 249 - 252.

[18]) Dingemans (J.J.)
Het onderzoek van vanillinsuiker.
Chem. Weekblad (27 déc. 1931), p. 694.

[19]) Levine (V.E.) Taterka (M.)
Color reactions of aldhydes and ketones with vanillin in alkaline medium.
Anal. Chim. Acta (1956), *15*, 237 - 245.

— avec les amines primaires aromatiques : coloration spécifique jaune d'une sensibilité allant du 1/100e au 1/1000e de mg selon l'amine [20] [21];

— avec certains acides aminés particuliers, tels que ornithine, lysine, sarcosine, proline, hydroxyproline, acides α, β et γ-pipéridine carboxyliques, on obtient après chromatographie une coloration ou une fluorescence [22];

— avec l'indol en milieu acide concentré : coloration rouge [23] [24];

— avec l'indoxyle : coloration rouge en milieu acide, coloration rouge-orange en milieu alcalin [24] [25];

— avec l'anthrone en milieu sulfurique concentré : coloration bleue [26];

— avec l'orcinol: coloration rouge-cerise en milieu acide [24] [27];

— avec de nombreux autres phénols en milieu sulfurique concentré [28]

---

[20] Tomas Olcesea
New reagent for primary arylamines.
Rev. facultad farm. y bioquim. (1949), *10*, 1 - 8.

[21] Pedrana (R.A.)
A new color test specific for free primary aromatic amine groups.
Rev. col. farm. nacl. (1951), *18*, 51 - 55.

[22] Curzon (G.) Giltrow (J.)
A chromatographic color reagent for a group of amino acids.
Nature (1953), *172*, 356 - 357;
(1954), *173*, 314 - 315.

[23] Blumenthal
Biochemische Zeitschrift, *19*, 526.

[24] Tokuya Harada et Ziro Nikuni
A new becterium in urine rohich makes lignin red.
VI. Mechanism of the color reaction. Structure of lignin.
J. Agr. Chem. Soc. Japan (1950), 23, 415 - 421.

[25] —— ibid.
Mechanism of color reaction between liguin and indoxyl.
Mem. Inot. Sci. Ind. Research Osaka Univ. (1950), *7*, 163 - 164.

[26] Eiji Fujimori
Activation and deactivation of fluorescence in π-electronic systems.
II. Absorption and fluorescence spectra in the activation of fluorescence in systems of anthrone with aldehyde, ketone, alcohol, phenol and aniline.
Chem. Soc. Japan, Pure Chem. Sect. (1954), *74*, 983 - 989.

[27] Bevenue (A.) Williams (K.T.)
Color reaction of certain aldehyde with orcinol.
Chemist Analyst (1952), *41*, 5 - 7.

[28] Ekkert (L.)
Condensation des alhéhydes sur des phénols en milieu sulfurique.
Pharm. Zhalle (1927), *68*, 563.

+ phénol : jaune-vert
+ phloroglucinol : rouge
+ pyrocatéchol : jaune puis rose
+ pyrogallol : rouge
+ résorcinol : rouge
+ thymol : rouge
+ carvacrol : rouge

— avec ces mêmes phénols, on obtient en milieu acide chlorhydrique concentré des colorations analogues [29]);

— avec le β-naphtol en milieu chlorhydrique concentré : coloration jaune, fluorescence jaune-vert [29]);

— avec le β-naphtol en milieu sulfurique concentré : coloration jaune, fluorescence jaune-vert [30]);

— avec l'α-naphtol en milieu sulfurique concentré : coloration rouge et bleue dichroïque [30]) [31]);

— avec l'essence de santal en milieu acétochlorhydrique : forte coloration rouge cerise virant au violet bleu à chaud, puis au vert après 24 heures [32]);

— avec les alcools aliphatiques en milieu sulfurique concentré, on obtient des colorations diverses selon l'alcool en réaction, la quantité d'acide et la dilution [33]);

— utilisée comme révélateur des polyols après chromatographie, la vanilline donne des taches gris-bleu [34]);

---

[29]) Cité par Pesez (M.) Poirier (P.)
Ed. 1954, t. 3, p. 175.

[30]) Wellmann
Propriétés et dosage de la vanilline.
Ann. Ch. anal. (1899), *4*, p. 174.

[31]) Denigès (G.)
Bull. Trav. Soc. Pharm. Bordeaux (1908), *48*, 257.

[32]) Bonnema
Réaction de la vanilline.
Ann. Ch. anal. (1898), *3*, p. 395.

[33]) Rosenthaler (L.) Vegezzi (G.)
Über Farbenreaktionen von Alkoholen.
Mitt. Lebensm. Hyg. (1952), *43*, 370 - 388.

[34]) Godin (P.)
A new spray reagent for paperchromatography of polyols and cetoses.
Nature (1954), *174*, 134.

— avec l'acide glyoxylique en milieu sulfurique : coloration jaune [35]);

— avec l'o-dianisidine en solution saturée dans l'acide acétique : coloration rouge-orange à froid, rouge à chaud [36]);

— en milieu chlorhydrique [37])

avec la morphine : coloration violet

avec l'oxydimorphine : coloration verte ou bleu-vert;

— avec une goutte de pyridine [38]) ou de pyrrole [39]) et une goutte d'une solution aqueuse de sulfate de cuivre : coloration ambre caractéristique;

— en milieu pyridiné [40])

a) avec de l'eau oxygénée : couleur rouge;

b) avec une goutte de solution de sulfate de cuivre à 3 % au bain-marie bouillant : couleur rouge;

— en solution dans de l'eau boratée à 5 % [40])

a) avec de l'eau oxygénée à température ordinaire : légèrement jaune;

b) avec une goutte de solution de sulfate de cuivre à 3 % : coloration jaune jaunâtre;

— avec les sulfamides, il se développe une coloration qui permet leur dosage en solution éthanolique acide [41]);

— les stéroïdes sont révélés après chromatographie par la vanilline en solution sulfurique ou phosphorique.

---

[35]) Pesez (M.)
Bull. Soc. chim. (1936), [5], *3*, 676.

[36]) Wasicky (R.) Frehden (O.)
Mickrochimica Acta (1937), *1*, 55.

[37]) Drevon (M.B.)
J.P.C. (1937), *8*, t. 26, 292.

[38]) Roura (W.E.P.)
New microchemical reactions of vanillin.
Rev. asoc. bioquim. argentina (1954), 19, 227 - 233.

[39]) —— ibidem.
New vanillin reactions.
Publs. inst. invest. microquim., Univ. nacl. litoral (1956), *22*, N° 20, 169 - 171.

[40]) Marzat (J.) Romain (P.) Liermain (A.)
Oxydations de phénols en présence de borate ou de pyridine.
Bull. Soc. Pharm. Bordeaux (1953), *91*, 7 - 9.

[41]) Bellotti (A.) Mossini (F.)
Sul dosaggio colorimetrico di derivati sulfonammidici con vanillana.
Ateneo parmense (1960), *31*, N° 6, 832 - 838.

Comme le montre la liste ci-dessus, qui n'est d'ailleurs pas exhaustive, la vanilline donne des réactions colorées avec presque toutes les catégories de composés organiques; ceci en fait un réactif très général dont les utilisations sont aussi nombreuses que variées.

Chapitre 2

PROPRIÉTÉS PHYSIOLOGIQUES DE LA VANILLINE

Du point de vue physiologique, la vanilline a fait l'objet de plusieurs études tant chez l'Homme que chez l'animal.

Elle manifeste des propriétés **cholérétiques** [1] : la dose minimum active pour le chien est de 0,02 g/kg de vanillinate de sodium; administré en intra-veineuse, ce composé augmente considérablement l'excrétion de la bile, surtout dans l'heure qui suit.

Sur le **cœur isolé** d'Helix aspersa [2]), on observe, sous l'effet d'une concentration de 1 à 5 mM °/₀₀ de vanilline, une faible augmentation de l'amphitude des contractions, puis un *ralentissement* avec des phases de repos en diastole; si on augmente la concentration, le *cœur s'arrête en diastole.*

La vanilline possède également un pouvoir *dépresseur* du tonus et de la motricité des **fibres lisses** en général et des fibres intestinales et utérines en particulier [3]).

Dans l'organisme humain, la vanilline est transformée en acide vanillique. Celui-ci présente d'ailleurs des esters non toxiques à propriétés fungicides et microbicides [4]).

---

[1]) Mercier (F.) Detrie (J.) Sestier (M.R.)
Action cholérétique expérimentale de la vanilline et de l'homovanilline.
Bull. Soc. Pharm. Marseille, bull. trim. (fév. 1952), 39 - 43.

[2]) Caujolle (F.) Meynier (D.) Alary (P.)
Effets des vanillines et des éthylvanillines sur le ventricule isolé d'Helix aspersa.
C. R. Soc. biol. (1954), *148*, 257 - 260.

[3]) Caujolle (F.) Meynier (D.)
Effets de la vanilline, o-vanilline et éthylvanilline et des dialdéhydes correspondants sur les muscles lisses, l'intestin isolé ou l'utérus.
Ann. pharm. franç. (1954), *12*, 418 - 458.

[4]) Pear (I.A.)
Vanillic acid esters as preservatives.
Food industr. (1945), *17*, 99.

Sa **toxicité** [5]) est faible puisque sa DL_{50} pour la souris est de 0,78 g/kg, très voisine de celle de l'éthylvanilline (0,40 g/kg). Néanmoins il arrive que la vanilline provoque chez l'Homme une **maladie chronique** appelée **vanillisme.**

LE VANILLISME

On a signalé depuis longtemps des accidents causés par la vanille puisque Layet [6]) en parle déjà en 1883 et que depuis cette époque de nombreux auteurs ont fait des observations intéressantes. Il semble que les cas d'intoxication professionnelle soient les seuls vraiment établis alors qu'on attribue plutôt les accidents dus à une ingestion de produits vanillés ou vanillinés à leurs falsifications.

Quoi qu'il en soit, le vanillisme se manifeste de façon très polymorphe [7]), ou par une atteinte des téguments et des muqueuses, ou par des phénomènes généraux.

Le **tableau clinique** est très variable selon les individus et la gravité de l'affection. Les *accidents cutanés* attirent le plus souvent l'attention et sont d'ailleurs les plus importants. Dans les cas légers, l'intoxication vanillique peut se traduire par des picotements et un prurit localisé le plus souvent aux doigts. Dans les cas plus graves, apparaissent des placards érythémateux ou des papules ou les deux, qui parfois restent localisés et parfois se généralisent. Les éruptions généralisées s'accompagnent quelquefois d'une alopécie sourcilière ou de sensations de brûlure de la face et des paupières.

---

[5]) Caujolle (F.) Meynier (D.)
Toxicité de la vanilline, o-vanilline et éthylvanilline et de leurs méta-aldéhydes correspondants.
Ann. pharm. franç. (1954), *12*, 42 - 49.

[6]) Layet (A.)
Etude sur le vanillisme ou accidents causés par la vanille.
Revue d'Hygiène (sept. 1883).

[7]) Bui-Xuan-Nhuan
Le vanillisme.
Dans Bouriquet (G.), Encycl. biol., t. 46, ch. 17, pp. 647 - 662, Ed. Lechevalier, Paris (1954).

Des *phénomènes généraux* peuvent précéder les manifestations cutanées; d'autres fois, ils les acompagnent. Ainsi, certains sujets présentent des céphalalgies plus ou moins violentes, accompagnées ou non d'essoufflement, de somnolence, d'insomnie, de transpiration, de vomissements, de diarrhée, de tachycardie ou de troubles visuels avec inflammation des paupières et sécrétion lacrymale abondante. Par ailleurs, on note souvent chez les femmes des troubles génitaux qui précèdent tous les autres : menstruation avancée, règles prolongées, plus abondantes, parfois même hémorragiques. Si, le plus souvent, les symptômes généraux ne durent que quelques jours, les éruptions cutanées disparaissent plus lentement et peuvent même être tenaces.

La plupart des ouvriers finiraient par acquérir une certaine accoutumance, alors que d'autres sont victimes de récidives qui peuvent aller jusqu'à leur interdire toute manipulation de vanille. Parmi les sujets les plus sensibles se classeraient les roux et les blonds, les châtains et les bruns étant beaucoup plus résistants [8]).

Les **causes** du vanillisme paraissent encore mal définies. On retient cependant comme possibles, le suc de vanille verte qui s'avère très acide et corrosif, la vanilline, les huiles essentielles, les résines et des produits antiseptiques ou servant à restaurer les vanilles épuisées. Les expériences de vanillisme expérimental donnent des résultats contradictoires, surtout quand elles sont pratiquées sur des animaux de laboratoire; mais elles sont toutes positives quand on dépose du suc de vanille verte sur l'avant-bras ou la face de n'importe quel sujet humain.

Le **traitement** du vanillisme consiste à mettre le sujet à l'abri des contacts avec la vanille, à saupoudrer de talc les éruptions généralisées et à enduire les érythèmes papuleux localisés de pâtes émolientes à base d'oxyde de zinc, de vaseline ou d'amidon. Les céphalalgies étant le plus souvent rebelles, le traitement interne se réduit pratiquement à très peu de choses.

Les **mesures prophylactiques** contre le vanillisme ressemblent à celles concernant toutes les dermatoses professionnelles : autant que possible, on conseille d'utiliser des gants de caoutchouc, de ne pas se toucher les yeux ni la figure au cours du

---

[8]) Desoille (H.) Meyer (A.) Massinot (A.)
Quelques notions étiologiques sur le vanillisme.
Arch. Maladies prof. Méd. Trav. Sécur. Soc. (1946), 7, No 2, 120 - 121.

travail et de se nettoyer soigneusement les mains à l'eau chaude. Il faut veiller également à la bonne ventilation des locaux et choisir le personnel avec soin en excluant des ateliers les jeunes filles à l'âge de la puberté et les femmes en état de grossesse.

Le vanillisme en tant que maladie professionnelle assez fréquente pose évidemment une question de médecine légale; mais vu le caractère polymorphe de cette affection, une législation est difficile à établir; aussi les pouvoirs publics ne semblent-ils pas s'en être préoccupés.

Chapitre 3

ISOLEMENT DE LA VANILLINE

L'isolement de la vanilline avant tout dosage est pratiquement rendu nécessaire par l'absence de réaction spécifique de ce composé. Or on opère le plus souvent en milieu complexe où la vanilline est loin d'être quantitativement prédominante. Ceci a donc amené très tôt les chercheurs à tenter de la séparer.

Actuellement, on dispose de plusieurs techniques d'inégale valeur :

A) l'extraction
B) la défécation
C) l'électrophorèse
D) la chromatographie.

Parfois on utilise successivement plusieurs de ces procédés.

A) EXTRACTION

Pour extraire la vanilline, on se base sur sa faible solubilité dans l'eau, surtout en milieu acide, et sur sa dissolution facile dans de très nombreux solvants organiques. S'il faut épuiser un produit solide, à peu près tous sont valables : on emploie de préférence l'*éther acide* et le *toluène*. Mais, s'il s'agit d'épuiser un liquide vanilliné, on choisit un solvant qui ne soit pas miscible. Or c'est pratiquement impossible dans le cas des extraits de vanille à fort degré alcoolique. Sörensen et coll. [1]) ont employé les

[1]) Sörensen (N.A.) Mehlum (J.)
Extraction of vanillin from its solutions.
Norw. (1951), 77, 094, jun. 11.

esters acétoacétique et malonique ou des β-dicétones de poids moléculaire assez élevé.

Certains auteurs ont pensé extraire, non plus la vanilline, mais ses combinaisons : dérivé bisulfitique, hydrazone, 2-4 dinitrophénylhydrazone etc...

Mais le plus souvent, les méthodes extractives s'avèrent très imparfaites et, en tout cas, non spécifiques. Cela oblige à les répéter au moins deux ou trois fois sur les liquides, au risque de voir se former chaque fois des émulsions lentes à se détruire. Néanmoins, en ajoutant à l'inconnu à extraire une quantité connue de vanilline et en effectuant l'extraction de ce « recovery » de la même façon que pour l'inconnu, on parvient à connaître à peu près le pourcentage de vanilline extraite.

Quel que soit le choix du solvant, celui-ci entraînera en même temps certains produits chimiquement voisins utilisés parfois par les fraudeurs ou des substances pouvant intervenir sur le dosage ultérieur de la vanilline. Or, ces méthodes de dosage n'étant pas spécifiques, les résultats obtenus à la suite d'un essai d'isolement par extraction, risquent d'être entachés d'erreur, sans qu'on puisse savoir à priori dans quel sens. Aussi l'extraction seule n'est-elle que rarement préconisée comme technique d'isolement.

B) DÉFÉCATION

La défécation remplaçait obligatoirement l'extraction quand on opérait sur un liquide vanilliné miscible aux solvants organiques. Mais on l'utilise fréquemment sur n'importe quel liquide pour éviter une trop grande dilution de la vanilline présente et aussi pour gagner du temps.

On se sert de solutions d'acétate de plomb de composition et de concentration diverses : l'acétate doit être neutre et en solution à 8 % pour Winton et Bailey [2]); dans la méthode de Folin

[2]) Winton (A.L.) Bailey (E.M.)
La détermination de la vanilline, de la coumarine et de l'acétanilide dans les extraits de vanille.
Journ. Am. Chem. Soc. (18199), 21;
(1905), 27, 705;
cité par Bouriquet
(G.), Encycl. biol., t. 46 (éd. 1954), pp. 596 - 597.

et Denis [3]) officielle aux Etats-Unis, il faut mélanger 5 % d'acétate neutre et 5 % d'acétate basique de plomb. Mais les deux défé-quants entraînent des pertes en vanilline, alors que ni l'un ni l'autre n'élimine entièrement tous les composés gênant son dosage ultérieur. C'est pourquoi Maurel et Lalement [4]) combinent la défécation par l'acétate de plomb à 10 % avec l'extraction par l'éther avant de procéder à une séparation chromatographique.

C) ÉLECTROPHORÈSE

Au moyen de l'*électrophorèse en continu,* il est possible de séparer en 30 heures la vanilline de composés chimiquement très voisins [5]). On parvient à un résultat analogue en utilisant la différence de mobilité *ionophorétique* dans un gel d'agar-agar [6]). La séparation électrophorétique sur couche mince serait également réalisable [7]) puisqu'elle a été réussie pour d'autres phénols [8]). Mais ces méthodes nécessitent un appareillage particulier et leur mise au point peut s'avérer délicate.

---

[3]) Folin (O.) Denis (W.)
A new colorimetric method of the determination of vanillin in vanilla extracts.
Journ. Ind. Eng. Chem. (1912), *4,* 670;
cité par Bouriquet, *ibid.,* pp. 574 - 575.

[4]) Maurel (A.) Lalement (S.)
Etude des falsifications des extraits de vanille.
Ann. Fals. Fraud. (1952), Nos 523 - 524, 257 - 267.

[5]) Jaakko Halmehaski
Continuous electrophoresis of phenolic compounds.
Suomen Kemistilehti (1962), *35 B,* Nos 7 - 8, 115 - 116.

[6]) Peniston (Q.P.) Agar (H.D.) McCarthy (J.L.)
Ionophorectic analysis in agar gels.
Anal. Chem. (1951), *23,* 994 - 999.

[7]) Randerath (K.)
Dünnschicht - Chromatographie.
Verlag Chemie, GMBH., Weinheim/Bergstr. (1962), pp. 63 - 67.

[8]) Pastuska (G.) Trinks (H.) cité par Randerath, p. 66.
Chemiker - Ztg (1961), *85,* 535.

D) CHROMATOGRAPHIE [9])

Le grand nombre et la diversité des techniques chromatographiques rend toute classification imparfaite. Nous distinguerons cependant :

1) chromatographie sur colonne
2) chromatographie sur papier
3) chromatographie en couche mince
4) chromatographie en phase gazeuse

1) Chromatographie sur colonne

Considérant la vanilline comme un ion, certains auteurs utilisent des *colonnes échangeuses d'ions* à substrats divers : par exemple, la Frankonite KL [10]) ou l'Amberlite IRA -400 [11]). On a également procédé de cette façon avec les dérivés bisulfités de la vanilline et d'autres aldéhydes [12].

---

[9]) On trouvera sur cette question de bonnes bibliographies de :
- LEDERER (E.) LEDERER (M.)
Chromatography.
2e éd. Elsevier, Amsterdam (1957), pp. 168 - 169.
- BLOCK (R.J.) ZWEIG (G.)
Manual of paper chromatography and paper electrophoresis.
Academic Press Inc., New-York (1958), pp. 340 - 345, 377 - 379.
- DIETRICH (P.) dans LEDERER (E.)
Chromatographie en chimie organique et biologique. Vol. I.
Ed. Masson, Paris (1959), p. 411.
- DEMOLE (E.) dans *ibid.* p. 429.
- HAIS (J.M.) MACEK (K.)
Handbuch der Papierchromatographie. Band II.
Veb. Gustav Fischer Verlag, Jena (1960), pp. 63 - 68, 81 - 83.

[10]) MEYER (F.) MEYER (E.)
Detection of eugenol, isoeugenol, and vanillin.
Arch. Pharm. (1957), *290*, 109 - 117.

[11]) GABRIELSON (G.) SAMUELSON (O.)
Utilization of ion exchangers in analytical chemistry.
Acta Chem. Scand. (1952), 6, 729 - 737 (angl.).

[12]) —— ibid.
Svensk. Kem. Tid. (1950), *62*, 214 - 220 (angl.)

Mais le plus souvent, on fait appel à la *chromatographie de partage* sur *silice* ou sur *alumine*. Ainsi ENSMINGER [13]), qui a sérieusement étudié cette question, décrit une méthode où le substrat est un acide silicique préparé de façon particulière, et l'éluant l'iso-octane; les résultats obtenus semblent meilleurs pour les extraits de vanille que pour les produits sucrés. ROSEN et coll. [14] ainsi que MONTES [15]) transforment d'abord la vanilline et autres aldéhydes ou cétones en 2-4 dinitrophénylhydrazones; puis ils procèdent à leur séparation, les uns sur une colonne contenant un mélange d'acide silicique et de célite, l'autre sur un mélange d'acide silicique et de bentonite. NIVOLI [16] prépare une alumine qui retient la vanilline d'une solution toluénique, mais laisse passer la coumarine. BROCKMANN et VOLPERS [17]) préfèrent une alumine rendue fluorescente par addition de morine. Et la liste des nombreuses autres variantes n'est évidemment pas close.

2) Chromatographie sur papier

C'est dans ce domaine surtout que l'imagination des chercheurs a déployé des trésors d'ingéniosité puisque nombreux sont les papiers et innombrables les solvants. Nous ne citerons que les méthodes les plus employées ou les plus représentatives des diverses possibilités qu'offre la chromatographie sur papier.

---

[13]) ENSMINGER (L.G.)
J. of A.O.A.C. (1955), *38*, N° 3, 730 - 738;
(1956), *39*, N° 3, 715 - 721;
(1957), *40*, 423 - 433;
(1958), *41*, 613 - 616;
(1959), *42*, N° 3, 492 - 493;
(1960), *43*, N° 3, 611 - 617.

[14]) ROSEN (A.A.) SUNDSTROM (K.V.Y.) VOGEL (W.F.)
Anal. Chem. (1952), *24*, 412 - 413.

[15]) MONTES (A.L.)
Application of chromatography in a study of essential oils.
Anales asoc. quim. argentina (1952), *40*, 273 - 281.

[16]) NIVOLI (M.)
Chromatographic separation of vanillin from coumarin.
Ann. chim. (1953), *43*, 38 - 39 (Rome).

[17]) BROCKMANN (H.) VOLPERS (F.)
Chem. Ber. (1947), *80*, 77.
Cité par LEDERER (E.) *Chromatographie en chimie organique et biologique*. Vol. I, Ed. Masson, Paris (1959), p. 411.

a) *Chromatographie après défécation et extraction*

Maurel et Lalement [18]) procèdent à une défécation à l'acétate de plomb à 10 %, puis à une extraction à l'éther, et à l'ammoniaque; enfin ils chromatographient par voie ascendante durant 16 h sur papier Durieux n° 122 les résidus de l'éther acide et de l'éther ammoniacal solubilisés dans l'alcool à 95° GL. Avec l'isobutanol ammoniacal comme solvant, ils trouvent un Rf de la vanilline égal à 0,40.

Chovin, Stoll et Bouteville [19]) préconisent une défécation au sous-acétate de plomb (qu'il faut laisser en contact pendant 24 h), puis une extraction par l'éther; on reprend le résidu de l'éther par de l'alcool avant de chromatographier par voie ascendante avec du butanol ammoniacal.

Selon Deshusses et Desbaumes [20]), si l'alcool est présent, il faut d'abord l'évaporer au bain-marie, puis déféquer par l'acétate basique de plomb [21]) et extraire par l'éther. La chromatographie ascendante de l'extrait éthéré s'effectue sur papier Whatman n° 1 pendant une nuit : on arrête la migration quand la hauteur du front est de 21 cm. Le solvant est l'isobutanol saturé d'ammoniaque à 2 % qui donne un Rf de la vanilline égal à 0,26 (± 0,02).

Ces méthodes ont l'inconvénient d'être longues et non quantitatives. Elles permettent cependant une estimation approximative de la quantité de vanilline, et éventuellement de certains composés frauduleux, par comparaison, après révélation, de l'intensité de leurs colorations ou fluorescences avec des témoins. Par contre, les sucres présents dans certains produits vanillinés ne perturbent pas l'allure du chromatogramme.

---

[18]) Maurel (A.) Lalement (S.)
Etude des falsifications des extraits de vanille.
Ann. Fals. Fraud. (1952), Nos 523 - 524, 257 - 267.

[19]) Chovin (P.) Stoll (S.) Bouteville (Y.)
Un composant naturel de l'arôme de vanille : l'aldéhyde p-hydroxybenzoïque : extraction, caractérisation.
Ann. Fals. Fraud. (1954), Nos 545 - 546, 187 - 191.

[20]) Deshusses (J.) Desbaumes (P.)
Recherche par chromatographie sur papier de la vanilline et de l'éthylvanilline dans les denrées alimentaires.
Mitt. Lebensmitteluntersuchung u. Hyg. (1957), *48*, No 2, 49 - 58.

[21]) Acétate basique de plomb de la Pharmacopée Helvétique.

b) *Chromatographie simple :*

Au début de l'application de la chromatographie sur papier à l'isolement de la vanilline, on employait principalement comme solvant le butanol ammoniacal. C'est le cas de :

— Gailey [22])
chromatographie ascendante durant 7 h sur papier Whatman n° 1
solvant : n-butanol (25 ml) + ammoniaque 1,2 N (15 ml)

— Simony [23])
solvant : n-butanol 50 ml
eau distillée 7,5 ml
ammoniaque concentré 2,5 ml
Rf de la vanilline : 0,47

— Lagneau [24])
chromatographie ascendante
papiers : Whatman n° 1, Durieux, Arches 302
migration : 24 cm
solvant n-butanol ammoniacal
Rf de la vanilline : 0,41

— Pear et Beyer [25])
solvant : butanol / ammoniaque 2 %
Rf de la vanilline : 0,44.

Mais très rapidement, on a essayé des systèmes de solvants nouveaux. Ainsi Pear et Beyer [25]) préconisent le mélange butanol / pyridine / eau (10/3/3 v/v) et trouvent comme Rf de la vanilline : 0,87. Vitte et Boussemart [26]) préfèrent le butanol saturé

---

[22]) Gailey (W.R.)
Detection of ethylvanillin in vanilla extract. A chromatographic method.
Chemist Analyst (1950), *39*, 59.

[23]) Simony (R.)
Etude morphologique histologique et chimique des Vanilles.
Thèse N° 636 Fac. Pharma. Strasbourg (1953).

[24]) Lagneau (Ch.)
Note sur la composition des extraits de vanille.
Ann. Fals. Fraud. (1953), N°s 539 - 540, 435.

[25]) Pear (I.A.) Beyer (D.L.)
J. Ann. Chem. Soc. (1954), *76*, 6106.

[26]) Vitte (G.) Boussemart (E.)
Séparation par chromatographie de partage sur papier de la vanilline et de la méthylvanilline.
Bull. Trav. Soc. pharm. Bordeaux (1950), *88*, N° 4, 177 - 180.

par une solution d'acide cyanhydrique à 2 % et opèrent la migration en atmosphère d'ammoniac; dans ces conditions le Rf de la vanilline est 0,39 et le spot est très net. Bergner et Sperlich [27]) utilisent les papiers Schleicher et Schüll 597 ou 604 et, comme phase mobile, un mélange éther / éther de pétrole. Barton et coll. [28]) prennent simplement une solution d'acide carbonique à pH 4 qui a l'avantage de migrer rapidement (38 cm en 4 h).

De nombreux auteurs n'ont pas isolé la vanilline pour elle-même; ils ont plutôt cherché des méthodes qui donnent des renseignements sur la pureté, l'origine ou le mode d'extraction des extraits de vanille. Pour cela, ils chromatographient sur la même feuille des extraits « standard » et des inconnus pour les comparer. Dans ce but, Burchfield, Prill et Fisher [29]) ont testé plusieurs solvants. Ainsi ils utilisent la partie supérieure du mélange isobutanol / acide acétique / eau (20/0,8/15 *v/v*) pour déceler les substances végétales étrangères. Le mélange isopropanol / ammoniaque à 28 % / eau (8/5/15 *v/v*) sert à préciser l'origine des vanilles et le mélange acide acétique / acide chlorhydrique à 37 % / eau (30/3/10 *v/v*) leur permet de distinguer les extraits de vanille obtenus par extraction alcaline : ils opèrent une chromatographie descendante durant 12 à 16 h sur papier Whatman n° 1 ou 3 MM de grand format : (55 × 45 cm). Mitchell [30]) préfère un papier plus petit (20 × 20 cm). Enfin la méthode a été complétée par deux autres systèmes de solvants pour chromatographie ascendante d'une durée de 2 à 3 heures :

1) KOH	30 g	2) Bicarbonate de K	20 g
KBr	50 g	KBr	50 g
Ehtanol	200 ml	Ethanol	200 ml
Eau	ad 1000 ml	Eau	ad 1000 ml

---

[27]) Bergner (K.G.) Sperlich (H.)
Application of paper chromatography in the analysis of foods. Identification and separation of vanillin, ethylvanillin, piperonal, and coumarin.
Deut. Lebensm. Rundschau (1951), *6*, 314 - 318.

[28]) Barton (G.M.) Evans (R.S.) Gardner (J.A.F.).
Paper chromatography of phenolic substances.
Nature (1952), *170*, 249 - 250.

[29]) Burchfield (H.P.) Prill (E.A.) Fisher (D.)
Am. Perfumer Aromat (1958), *71*, N° 4, pp. 49 - 50, 52.

[30]) Mitchell (L.C.)
Journal of A.O.A.C. (1957), *40*, 999.

Jorysch [31]) d'une part, Stahl, Sullivan et Voelker [32]) d'autre part, ont étudié ces solvants et publient les chromatogrammes qu'ils ont obtenus avec chacun d'eux, tandis que Fitelson [33]) indique comment éviter les déformations des figures typiques provoquées par différentes substances étrangères.

c) *Chromatographie sur papier imprégné :*

Newcombe et Reid [34]) ont logiquement pensé à un papier bisulfité et leur solvant est un mélange hexane / chloroforme (9/1 v/v).

Une bonne méthode, recommandée par Mitchell [35]) consiste à imprégner au préalable le papier de formamide (2 ml dans 5 ml d'éthanol et compléter à 100 ml par de l'éther). La phase mobile est constituée par un mélange d'octanes.

Horst et McGlumphy [36]) utilisent avec satisfaction le papier imprégné selon Mitchell. Mais le solvant de Ter Heide et Lemmens [37]) (benzène / éther de pétrole 80-110° / méthanol : 2/10/1 v/v) donnant des traînées, ils ont remplacé l'éther de pétrole par le n-heptane; ainsi, ils séparent bien vanilline, éthylvanilline, méthylvanilline, héliotropine, aldéhyde anisique, coumarine

---

[31]) Jorysch (D.)
Collaborative study of the chromatographic evaluation of vanilla extracts.
Journ. of A.O.A.C. (1959), *42*, N° 3, 638 - 642.

[32]) Stahl (W.H.) Sullivan (J.H.) Voelker (W.A.)
Analysis of vanilla extracts. III. Use of paper chromatography in the analysis of pure and adulterated vanilla extracts.
Journ. of A.O.A.C. (1961), *44*, N° 3, 549 - 554.

[33]) Fitelson (J.)
Detection of foreign plant material in vanilla extract by paper chromatography.
Journ. of A.O.A.C. (1960), *43*, N° 3, 596 - 599.

[34]) Newcombe (A.G.) Reid (S.G.)
Chromatographic separation, with chemically treated paper, of aldehydes and ketones on the basis of their reactivity.
Nature (1953), *172*, 455 - 456.

[35]) Mitchell (L.C.)
Journ. of A.O.A.C. (1953), *36*, 1123 - 1127.

[36]) Horst (P.) McGlumphy (J.H.)
Recherche des falsifications dans les extraits de vanille.
Ann. Fals. Exp. chim. (1962), N°s 643 - 645, 264 - 273.

[37]) Ter Heide (R.) Lemmens (J.F.)
Perf. and Ess. Oil rec. January (1954).

et vanitrope. Le solvant de Deshusses et Desbaumes [38]) (isobutanol saturé par l'ammoniaque à 2 %) est plus favorable pour mettre en évidence l'aldéhyde p-hydroxybenzoïque et le mélange de Potter et Patton [39]) (alcool isoamylique / acide formique 5 N : 1/1 *v/v*) pour déceler le maltol.

Vonasek [40]) a essayé la formamide et la diméthylformamide comme phase fixe et obtient de bons résultats avec un mélange éther de pétrole / benzène (2/1 *v/v*). Sundt [41]) [42]) a choisi plutôt la diméthylformamide et, comme phase mobile, le système cyclohexane / acétate d'éthyle (5/1 ou 5/2 *v/v*) saturé au préalable de diméthylformamide / eau (5/2 *v/v*).

Plus particulière est la technique de Keichiro Yayashi et coll. [43]) qui imprègnent le papier d'une solution benzénique de Dow-Corning Silicone 1107 et font migrer avec une série de solvants divers.

d) *Chromatographie de combinaisons de la vanilline*

Plusieurs auteurs séparent d'abord la vanilline par diverses combinaisons et chromatographient ensuite les composés obtenus. Ainsi Sundt et Winter [44]) préparent les *2-4 dinitrophénylhydra-*

---

[38]) Deshusses (J.) Desbaumes (P.)
Recherche par chromatographie sur papier de la vanilline et de l'éthylvanilline dans les denrées alimentaires.
Mitt. Lebensmitt. und Hyg. (1957), *48*, 49.

[39]) Potter (F.E.) Patton (S.)
Journ. of Dairy Science (1956), *39*, 978 - 982.

[40]) Vonasek (F.)
Separation of vanillin, ethylvanillin, and their isomers by paper chromatography.
Prumysl potravinarsky (1958), *9*, 315.

[41]) Sundt (E.)
Paper chromatography in the analysis of artificial vanilla flavours.
Brochure of Firmenich & Cie, Genève (1959), p. 27.

[42]) —— ibid.
Paper chromatography of phenols.
J. Chromatog. (1961), *6*, 475.

[43]) Keichiro Yayashi et Yohei Hashimoto
Microanalysis of essentiel oil components. II. Paper chromatography of essentiel oil components by silicone-treated paper.
Pharm. Bull. (1956), *4*, 494 - 495.

[44]) Sundt (E.) Winter (M.)
Paper chromatography of 2 - 4 dinitrophenylhydrazone of aromatic carbonyl compounds.
Anal. Chem. (1958), *30*, N° 10, 1620 - 1622.

zones des composés carbonylés; la chromatographie s'effectue sur papier imprégné de diméthylformamide avec un mélange cyclohexane / cyclohexène comme phase mobile. MEIGH [45]) opère de même sur les phénylhydrazones, mais expose au préalable le papier à des vapeurs de diméthyldichlorosilane avant de faire migrer avec un solvant à deux phases.

JOPPIEN [46]) décrit également pour les phénylhydrazones une technique de chromatographie circulaire dans une atmosphère saturée d'ammoniac avec le benzène comme solvant.

PRILL et FISHER [47]) préparent les *semicarbazones* des composés carbonylés qu'ils séparent ensuite le mieux avec la phase supérieure du mélange n-butanol / éthanol / eau (27/3/10 v/v).

Quant à HYOJIRO UNO et coll. [48]), ils ont mis au point la séparation des *acides hydroxamiques,* soit par le système alcool isoamylique / acide acétique / eau (5/1/1 v/v), soit n-butanol / acide acétique / eau (5/1/1 v/v).

e) *Chromatographie à deux dimensions*

STAHL, VOELKER et SULLIVAN [49]) ont complété les méthodes chromatographiques à une dimension par une autre à deux dimensions qui fournit des renseignements très intéressants dans des cas douteux. Le premier développement ascendant sur papier Whatman 3 MM s'effectue avec le système éthanol / bicarbonate de potassium / eau (20/2/78 vol./poids/vol.). Comme second sol-

---

[45]) MEIGH (D.F.)
Separation of 2-4 dinitrophenylhydrazone of dicarbonyl and aromatic compounds by reversed-phase chromatography on paper.
Chemistry and Industry (1956), 986-988.

[46]) JOPPIEN (P.H.)
Nachweiss und Bestimmung von Vanillin und Äthylvanillin in Lebensmitteln.
Z. Lebensm. - Unters. u. Forschung (1961), *115,* N° 1, 20-26.

[47]) PRILL (E.A.) FISHER (D.)
Contribs. Boyce Thompson Inst. (1956), *18,* 299-301.

[48]) HYOJIRO UNO et AKIRA KOYAMA
Identification of aldehyde by paper chromatography.
J. Fermentation Technol. (1951), *29,* 219-221.

[49]) STAHL (W.H.) VOELKER (W.A.) SULLIVAN (J.H.)
Analysis of vanilla extracts. II. Preparation and reproduction of two dimensional fluorescence chromatograms.
Journ. of A.O.A.C. (1960), *43,* N° 3, 606-610.

vant, les auteurs font appel, soit à un mélange isopropanol / eau (75/25 v/v), soit tert-butanol / eau (75/25 v/v). Quoique plus longue, cette technique présente des avantages certains.

3) Chromatographie en couche mince

Dans leurs ouvrages respectifs, STAHL [50]) et RANDERATH [51]) citent les travaux de plusieurs auteurs ayant séparé la vanilline selon cette technique de plus en plus appréciée pour sa simplicité, sa rapidité et son efficacité.

Ainsi, sur plaques de Kieselgel G préparées à la main (sans étalateur), le Rf de la vanilline est de 0,70 avec le mélange benzène / dioxane / acide acétique (90/25/4 v/v), de 0,64 avec le benzène / méthanol / acide acétique (45/8/4 v/v), de 0,27 avec le benzène / méthanol (95/5 v/v). Ces solvants servant à séparer de nombreux autres phénols, ne sont vraisemblablement pas les seuls de leur catégorie à convenir pour la vanilline. Ainsi STAHL mentione le système n-butanol / isoamyléther (75/25 v/v) pour l'analyse des produits d'hydrolyse de la liguine et donne 0,58 comme Rf de la vanilline. Sur un mélange Kieselgel-Kieselgur (25+5), on recommande l'hexane / acide acétique (40/10 v/v) pour distinguer plusieurs antioxydants de la vanilline.

Comme par chromatographie sur papier, on a séparé les 2-4 dinitrophénylhydrazones de la vanilline et d'autres aldéhydes : on opère en cuve saturée sur Kieselgel G avec benzène / éther de pétrole E= 60-80° C (75/25 v/v) ou avec benzène / acétate d'éthyle (95/5 v/v) : les Rf sont respectivement 0,06 et 0,17 pour la vanilline.

Un autre procédé consiste à faire migrer la vanilline par du chloroforme, à pulvériser ensuite une solution de 2-4 dinitrophénylhydrazine sur la plaque avant de tourner de 90° pour une migration dans une deuxième direction avec du benzène.

---

[50]) STAHL (E.)
Dünnschicht-Chromatographie.
Springer-Verlag (1962), pp. 198, 200, 363, 398.

[51]) RANDERATH (K.)
Dünnschicht-Chromatographie.
Verlag Chemie, GMBH, Weinheim/Bergstr. (1962), pp. 176 - 177.

Mais le mérite revient à Sundt et Saccardi [52]) d'avoir essayé d'appliquer la chromatographie en couche mince aux constituants aromatiques de la vanille et à certaines de leurs falsifications. Ces auteurs préconisent quatre systèmes de solvants : A = éther de pétrole E = 50-70°C / acétate d'éthyle (2/1 *v/v*) et B = hexane / acétate d'éthyle (5/2 *v/v*) surtout pour mettre en évidence vanilline, éthylvanilline, pipéronal, méthylvanilline, vanitrope et différents isomères de la coumarine; C = chloroforme / acétate d'éthyle (98/2 *v/v*) pour distinguer plus particulièrement vanilline, éthylvanilline, méthylvanilline et aldéhyde p-hydroxybenzoïque; enfin D = décaline / chlorure de méthylène / méthanol (5/4/1 *v/v*) pour séparer o-vanilline et méthylvanilline. Quoique très intéressants, ces différents solvants n'ont pas toujours une efficacité parfaite puisque certains Rf sont très proches et que le système C laisse des traînées importantes. Il n'en reste pas moins que la chromatographie en couche mince est pleine de ressources et riche d'avantages pour l'analyse des produits vanillés et vanillinés.

4) Chromatographie en phase gazeuse

Nawar et Fagerson [53]) décrivent une technique qu'ils pensent assez généralement valable pour les combinaisons volatiles des aliments; mais leurs essais n'ont pas porté directement sur celles de la vanille. Underwood et Filipic [54]) ont séparé la vanilline dans le sirop d'érable par chromatographie en phase gazeuse de son extrait chloroformique et identifient les différents composés élués par leur spectre infra-rouge. Burchfield et Prill [55]) ont obtenu une

---

[52]) Sundt (E.) Saccardi (A.)
Thin-layer chromatography and paper chromatography of vanilla flavoring compounds.
Food Technol. (1962), *16*, N° 4, 89 - 91.

[53]) Nawar (W.W.) Fagerson (I.S.)
Technik zur Sammlung von flüchtigen Verbindungen aus Nahrungsmitteln für die gas-chromatische Analyse.
Annalitic. Chem. (1960), *32*, 1534 - 1535.

[54]) Underwood (J.C.) Filipic (V.J.)
Gas-chromatographic identification of components in maple sirup flavor extract.
J. of A.O.A.C. (1963), *46*, 334 - 337.

[55]) Burchfield (H.P.) Prill (E.A.)
Characterization of noncarbonyl volatiles of vanilla by gas chromatography.
Contrib. Boyce Thompson Inst. (1959), *20*, N° 3, 217 - 229.

courbe d'élution à quatre pointes caractéristiques pour les composés volatils non carbonylés de la vanille, ce qui leur permet une détection très fine des falsifications éventuelles. Et nul doute que la chromatographie en phase gazeuse ne nous fasse parvenir un jour à une meilleure connaissance du parfum de vanille dont nous savons si peu.

Révélation de la vanilline après chromatographie

Pour localiser la vanilline après chromatographie, on a préconisé de nombreux réactifs qui, après pulvérisation, donnent des taches colorées.

Parmi les révélateurs les plus communément rencontrés, la 2-4 dinitrophénylhydrazone fait apparaître la vanilline en orangé, mais teinte également le fond en jaune; le sulfate d'hydrazine (ou réactif de Dingemans) fournit avec les aldéhydes des hydrazones colorées; puis examinée aux rayons ultra-violets, la vanilline montre une fluorescence jaune-vert à reflets bleutés et l'éthylvanilline seulement une coloration jaune-brun sans fluorescence. Les chromatogrammes révélés à la benzidine chlorhydrique (ou réactif de Van Eyck modifié) ne présentent pas de coloration de fond et la vanilline apparue en jaune vif manifeste une forte fluorescence jaune-vert aux rayons ultra-violets.

On a aussi préconisé les réactifs de Schiff et de Nessler, le nitrate d'argent ammoniacal, le réactif phosphomolybdique et le phtalate d'aniline; mais ils sont bien moins sensibles. On a également pensé aux diazoïques, et plus particulièrement à ceux de la p-nitraniline, de la sulfaniline et de la benzidine.

Mais là ne s'arrête pas la liste des révélateurs possibles et qui ont effectivement été utilisés, car on a le choix entre les innombrables réactions colorées de la vanilline (cf. plus haut).

Conclusion sur les méthodes d'isolement de la vanilline

Le grand nombre des méthodes préconisées prouve bien, si besoin était, la difficulté très réelle qu'il faut résoudre pour isoler vraiment la vanilline et il est délicat de faire un choix. Tout dépend si on veut simplement caractériser la vanilline, ou bien la

différencier de substances gênantes, voire frauduleuses, ou encore la séparer pour la doser. Néanmoins, on peut affirmer, sans risque de se tromper, que la chromatographie donne dans tous ces cas les meilleurs résultats et plus particulièrement la chromatographie en couche mince, mais il est nécessaire de choisir les solvants selon les autres composés présents à côté de la vanilline.

Chapitre 4

MÉTHODES DE DOSAGE DE LA VANILLINE

Voilà très longtemps déjà qu'on sait doser la vanilline. Et comme c'est l'un des principaux composants connus du parfum de la vanille, la législation en a fixé le taux, ce qui oblige la répression des fraudes à pouvoir le contrôler. C'est pourquoi on a cherché des méthodes valables pour les produits vanillés et vanillinés les plus divers et qui donnent des résultats aussi exacts que possible.

Pour exposer ces techniques, nous suivrons la classification suivante :

1) Titrages volumétriques
2) Méthodes gravimétriques
3) Dosages colorimétriques
4) Méthodes potentiométriques
5) Méthodes polarographiques et oscillopolarographiques
6) Méthodes spectrophotométriques
7) Dosages des différents groupements fonctionnels de la vanilline
8) Dosages particuliers après chromatographie ou électrophorèse.

1) TITRAGES VOLUMÉTRIQUES

Des méthodes déjà anciennes reviennent à un dosage acidimétrique mettant à profit l'acidité que confère à la vanilline son hydroxyle en 4 : on la neutralise directement en solution par la

soude 0,1 N. ZANOTTI [1]) utilise la phénolphtaléine comme indicateur et calcule que 1 ml de soude 0,1 N correspond à 0,0152 g de vanilline pure. PRITZKER et JUNGKUNZ [2]) saisissent le virage au bleu persistant de la thymolphtaléine. Ces techniques sont utilisables pour les solutions aqueuses de sucres vanillés et vanillinés; mais 10 g de sucre augmentent la chute de burette de 0,3 à 0,5 ml. Il peut être avantageux d'ajouter de l'alcool, la vanilline étant peu soluble dans l'eau; dans ce cas, l'excès de soude 0,1 N n'est plus que de 0,05 ml. Par ailleurs, l'appréciation du bleu de la thymolphtaléine est gênée par l'apparition en cours de dosage d'une légère coloration jaunâtre. Aussi GARROS-PATIN et HAHN [3]) préfèrent-ils la phénolphtaléine dont la couleur rose est moins influencée.

SHARP [4]) oxyde d'abord quantitativement la vanilline par l'eau oxygénée à 6 % en mileu alcalin et obtient ainsi cinq équivalents d'acide pour une molécule de vanilline; dans ces conditions, la sensibilité du dosage se trouve nettement améliorée et le virage est plus facile à saisir que sur la solution de départ. Mais une vanilline pure donne toujours un résultat de 103 %; cela oblige à introduire un facteur de correction qui donne pour une vanilline pure une réponse égale à 100 %.

DELVAUX et DORMAL [5]) complètent le dosage acidimétrique direct par un tirage volumétrique de la fonction aldéhyde. Pour cela, ils ajoutent à une solution de vanilline une solution de chlorhydrate d'hydroxylamine et titrent ensuite l'acide chlorhydrique libéré par la soude 0,5 N en présence de bleu de bromothymol : 1 ml de soude 0,5 N annonce 76 mg de vanilline. Des chiffres concordants pour ces deux méthodes leur permettent d'affirmer la pureté

---

[1]) ZANOTTI (V.)
Titrage par voie volumétrique de la vanilline synthétique du commerce.
Boll., Chim. farm. (1927), p. 33.

[2]) PRITZKER (J.) JUNGKUNZ (R.)
Analytisches über Vanillin und Vanillinzucker.
Chem. Zeitung (1928), *52*, 537.

[3]) GARROS-PATIN (J.) HAHN (J.) dans BOURIQUET (G.)
Encycl. biol. éd. 1954, t. 46, ch. 14 : La chimie de la vanille (p. 589).

[4]) SHARP (L.K.)
The assay of vanillin.
Analyst (1951), *76*, N° 901, 215 - 219.

[5]) DELVAUX (E.) DORMAL (S.)
Note sur l'examen de pureté des vanillines.
J. Pharm. Belg. (1947), *2*, 175 - 181.

d'une vanilline à condition d'opérer sur une prise d'essai importante.

Tomicek et coll. [6]) ainsi que Zyka [7]) ont décrit un dosage par bromométrie : une quantité suffisante d'une solution acétique de brome 0,1 N oxyde la vanilline; l'excès de brome restant déplace l'iode d'une solution aqueuse d'iodure de potassium; on titre classiquement l'iode libéré par l'hyposulfite de sodium. Quant à Beck [8]), il effectue un dosage percuprimétrique avec le composé de formule $K_7 Cu I_2 O_{12}$ qui est un oxydant puissant.

Conclusion sur les méthodes volumétriques

Simples et rapides, mais pas spécifiques, les méthodes volumétriques ne sont pratiquement utilisables que pour une vanilline dont on veut vérifier la pureté ou pour les sucres vanillés ou vanillinés (en l'absence de farine ou d'amidon). Mais leur peu de sensibilité exige une prise d'essai importante pour une précision relative.

2) MÉTHODES GRAVIMÉTRIQUES

Elles consistent à isoler et à peser, parfois la vanilline elle-même, le plus souvent un dérivé de sa fonction aldéhydique.

a) Dosage pondéral de la vanilline elle-même

La méthode de Winton et Bailey [9]), officielle aux Etats-Unis, s'applique particulièrement aux extraits de vanille; elle permet

---

[6]) Tomicek (O.) Zyka (J.)
The bromometric assay of some drugs.
Casopis Ceskeho Lekarnictva (1949), *62*, 49 - 60.

[7]) Zyka (J.)
Bromine in glacial acetic acid as analytical solution. Determination of a few pharmaceutically important compounds.
Pharmazie (1954), *9*, 812 - 824.

[8]) Beck (G.)
Percuprimetric titrations.
Mikrochemie ver. Mikrochim. Acta (1951), *38*, 152 - 159.

[9]) Winton (A.L.) Bailey (E.M.)
La détermination de la vanilline, de la coumarine et de l'acétanilide dans les extraits de vanille.
Journ. Am. Chem. Soc. (1899), *21*; (1905), *27*, 705.

en plus de doser, sur une même solution, la vanilline en présence de coumarine et d'acétanilide ainsi que l'indice de plomb.

On dilue l'extrait par de l'eau distillée et on chasse l'alcool par évaporation au bain-marie. On défèque ensuite par une solution d'acétate neutre de plomb à 8 %. Après un repos de 18 h à 37-40° C, on décante sur filtre sec et l'on recueille le filtrat que l'on extrait par l'éther. Lorsqu'on agite cette solution éthérée avec de l'ammoniaque diluée, la vanilline, par sa fonction aldéhyde, donne un composé très soluble dans l'eau, alors que la coumarine reste en totalité dans l'éther où l'on peut la doser ou simplement la mettre en évidence par le précipité brun-vert qu'elle donne avec l'iode. On acidifie aussitôt les solutions ammoniacales avec l'acide chlorhydrique pour éviter tout brunissement qui va de pair avec une perte de vanilline et on extrait à nouveau par l'éther. Les solutions éthérées sont évaporées à température ordinaire dans une capsule tarée et desséchées jusqu'à poids constant dans un dessicateur à acide sulfurique.

Cette méthode très longue et délicate donne, selon Ensminger [10]), des résultats variables avec les opérateurs. Mais elle permet plusieurs déterminations différentes sur la même solution de départ.

b) Procédé au bisulfite de TIEMANN et HAARMANN

Après dissolution de la vanilline dans l'éther ou extraction par le même solvant au Soxhlet pendant plusieurs heures, on agite la solution éthérée avec une solution demi-saturée de bisulfite de sodium; dans la fraction aqueuse passe la combinaison bisulfitique de la vanilline, parce qu'insoluble dans l'éther. On traite alors les liqueurs bisulfitiques par l'éther pour les débarrasser de leurs impuretés. Puis, à l'aide d'acide sulfurique dilué, on régénère la vanilline. Mais il faut ensuite éliminer, au moyen d'un courant d'hydrogène ou de gaz carbonique, l'acide sulfureux dissous. On épuise la liqueur acide par l'éther qu'on lave à l'eau avant de concentrer par une distillation prudente jusqu'à un résidu de 20 ml environ. Celui-ci est placé dans une capsule tarée et l'évaporation se poursuit à l'air libre, puis au dessicateur.

---

[10]) Ensminger (L.G.)
Analysis of vanilla extracts and imitations.
J. of A.O.A.C. (1954), *37*, 669 - 672.

Cette méthode s'applique surtout au dosage dans la vanille et donne des résultats convenables à condition qu'il n'y ait pas de falsification par un aldéhyde : il faut s'en assurer par ailleurs; mais elle est longue et fastidieuse à cause des nombreuses extractions et de la formation fréquente d'émulsions lentes à se détruire. De plus GARROS-PATIN et HAHN [11]) font observer que l'hydrolyse de la combinaison bisulfitique n'est pas commode et nécessite une assez grande quantité d'acide sulfurique. Enfin le barbotage destiné à éliminer le gaz sulfureux dure à lui seul 4 à 5 heures. Et si la concentration et l'évaporation de la solution éthérée terminale sont effectuées sans précaution ou à une température trop élevée, on risque des pertes importantes de vanilline qui se sublime déjà au-dessus de 30°C.

c) Méthode à la 2-4 dinitrophénylhydrazine [12])

On verse dans la solution à doser, en agitant continuellement, le réactif à la 2-4 dinitrophénylhydrazine. Après 1 h, on filtre le précipité sur un creuset en verre fritté et on lave avec l'acide chlorhydrique 2 N, puis à l'eau. Le poids de la phénylhydrazone obtenu après séchage à 100°C est multiplié par 0,4578 pour connaître la quantité de vanilline présente.

SHARP [13]) a étudié diverses modifications techniques de la méthode originale ci-dessus : il obtient les meilleurs résultats en chauffant 45 minutes au bain-marie après l'addition de la dinitrophénylhydrazine et en filtrant aussitôt sans laisser refroidir.

Mais il est à noter que tous les aldéhydes donnent une 2-4 dinitrophénylhydrazone dans ces conditions, ce qui rend la méthode inapplicable aux produits sucrés. Par ailleurs, PRILL et coll. [14]) préfèrent éliminer aussi les gommes et les résines des extraits de vanille.

---

[11]) GARROS-PATIN (J.) HAHN (J.)
Encycl. biol. éd. 1954, t. 46, ch. 14 : la chimie de la vanille (p. 573).

[12]) RUBIN (N.) BLOOM (A.)
A note on the determination of vanillin with 2 - 4 dinitrophenylhydrazine.
Am. J. Pharm. (1936), *108*, N° 9, 387 - 388.

[13]) SHARP (L.K.)
The assay of vanillin.
Analyst (1951), *76*, N° 901, 215 - 219.

[14]) PRILL (E.A.) PORTER (C.A.) STAPLES (R.C.) BURCHFIELD (H.P.)
Methods for the analysis of vanilla extracts for resins, carbonyl compounds, amino acids, and other organic acids.
J. of A.O.A.C. (1960), *43*, N° 1, 96 - 107.

d) Méthode au sulfate d'hydrazine

JASCHIK [15]) additionne une solution de sulfate d'hydrazine et une certaine quantité d'acétate de sodium pour faire précipiter la vanilline d'un liquide. Il filtre ce précipité rouge orangé, le lave, le sèche et le pèse. Le poids de l'hydrazone multiplié par 1,013 lui permet de connaître la quantité de vanilline en expérience. Cet auteur a remarqué que l'éthylvanilline n'avait pas besoin d'acétate de sodium pour précipiter et qu'il faut multiplier le poids de son hydrazone par 1,012. En solution alcoolique, l'éthylvanilline précipite seulement après une nuit et la vanilline donne une coloration jaune, ce qui permet d'évaluer chacun des composés quand ils sont tous deux présents.

e) Méthode au chlorhydrate d'hydroxylamine

On peut aussi déterminer après purification le poids de l'oxime que donne la vanilline avec le chlorhydrate d'hydroxylamine. En réalité, on préfère le plus souvent mesurer, après addition de ce réactif, la quantité d'acide chlorhydrique libéré parce que cette dernière détermination est à la fois plus aisée et plus précise, comme nous le verrons plus loin (cf. méthodes potentiométriques).

f) Méthode de HANUS [16])

Cet auteur part d'un extrait éthéré du produit à analyser; puis il évapore le solvant au bain-marie et dissout le résidu dans l'eau chaude (60° C environ). Il verse alors, en agitant, la métanitrobenzhydrazide en solution aqueuse. Après 15 minutes au bain-marie, il laisse reposer 24 h à température ordinaire. Puis le résidu est filtré dans un creuset de Goosch, lavé à l'eau froide et à l'éther de pétrole. Une fois séché à 100° C, le poids du produit de condensation multiplié par 0,4829 donne la teneur en vanilline dans la prise d'essai.

---

[15]) JASCHIK (S.)
The determination of vanillin and bourbonal alone and in the presence of each other.
Magyar Kem. Folyoirat (1950), *56*, 431 - 433.

[16]) HANUS (J.)
Über eine quantitative Bestimmung des Vanillins.
Zeitschrift für Untersg. der Nahrungs- u. Genussmittel (1905), *10*, 585.

Ce procédé est un des meilleurs, mais la métanitrobenzhydrazine est difficile à préparer.

Conclusion sur les méthodes gravimétriques

En ce qui concerne ces techniques en général, elles nécessitent toutes une quantité de vanilline assez importante dont la détermination est souvent faussée par des procédés d'isolement que nous avons déjà critiqués au chapitre précédent.

3) DOSAGES COLORIMÉTRIQUES

a) Coloration avec le réactif phospomolybdotungstique

La méthode de Folin et Denis [17]) est certainement la plus employée pour le dosage colorimétrique de la vanilline, surtout dans les extraits alcooliques. Sa version améliorée, officielle aux Etats-Unis, débute par une défécation à l'aide d'une solution à 5 % d'acétate neutre et 5 % d'acétate basique de plomb; on filtre rapidement sur filtre plissé. A une quantité connue du filtrat, on ajoute le réactif phosphomolybdotungstique; on agite avant de verser une solution de carbonate de sodium, qu'on a saturée à température ordinaire. Après avoir bien mélangé par retournement, on laisse la coloration bleue se développer et le précipité de phosphate se déposer complètement. On filtre rapidement, et, quand la solution est limpide, on compare dans les 30 minutes qui suivent la teinte de l'essai à celles d'une gamme-étalon de vanilline traitée de la même façon : à l'origine, cela se faisait au colorimètre de Duboscq et un seul étalon suffisait; actuellement, on opère au photocolorimètre avec un filtre rouge.

Lagneau [18]) précise qu'on obtient une courbe d'étalonnage pratiquement droite pour des concentrations allant de 125 à 500 µg de vanilline dans 50 ml. Mais ces limites sont trop étroites pour être pratiques.

---

[17]) Folin (O.) Denis (W.)
A new colorimetric method of the determination of vanillin in vanilla extracts.
Journ. Ind. Eng. Chem. (1912), *4*, 670.

[18]) Lagneau (Ch.)
Note sur la composition des extraits de vanille.
Ann. Fals. Fraud. (1953), Nos 539 - 540, 432.

C'est aussi l'avis de Dupaigne [19]; il a proposé de porter la quantité de réactif phosphomolybdotungstique de 5 à 15 ou 20 ml. Cette modification étend la zone d'utilisation à 3 ou 4 mg de vanilline et a l'avantage d'accélérer la précipitation qui gênait la lecture; d'après l'auteur, une seule filtration après 1 ou 2 h donne des solutions dont la limpidité reste parfaite. Enfin, une étude précise de l'évolution de la coloration dans le temps permet d'effectuer les dosages en série dans les conditions les plus pratiques et de lire n'importe quand.

Englis, Meermann et Wollermann [20]) suppriment toute filtration en opérant avec 5 ml de réactif de Folin et Denis et 1,25 de carbonate de sodium pour les 100 ml du volume final de la réaction. La lecture se fait après 30 minutes.

La méthode de Folin et Denis, après ces améliorations successives, n'en est que plus séduisante. Mais *elle ne peut être une coloration spécifique* puisque tous les mono-, di- ou triphénols la donnent. Sa valeur dans un dosage dépend donc de la défécation qui la précède et on connaît les critiques qui ont été faites à ce sujet (cf. chapitre précédent).

Si l'éthylvanilline est présente, elle ajoutera sa coloration à celle due à la vanilline. Le pipéronal et l'aldéhyde anisique, normalement présents dans le vanille de Tahiti et le vanillon, montrent la même réaction, mais faiblement selon Lagneau [18]). Par contre, Dupaigne [19]) rappelle très justement que *l'acide vanillique donne une coloration plus forte que la vanilline elle-même;* aussi la solution-étalon doit-elle être utilisée fraîche avant toute oxydation de la vanilline en acide.

D'après Garros-Patin et Hahn [22]), d'autres composés amènent encore des perturbations dans ce dosage : les amines aromatiques, les alcaloïdes et les sucres. Mestres [23]) signale en effet une substance soluble dans l'eau et dans l'alcool, non volatile, obtenue

---

[19]) Dupaigne (P.)
Note sur un dosage colorimétrique de la vanilline.
Fruits et Dérivés (1951), N° 15, 13 - 15.

[20]) Englis (D.T.) Meermann (G.) Wollermann (L.A.)
Further observations on the colorimetric determination of vanillin.
J. of A.O.A.C. (1958), *41*, N° 1, part. 1, 203 - 206.

[22]) Garros-Patin (J.) Hahn (J.) dans Bouriquet (G.)
Encycl. biol. éd. 1954, t. 46, ch. 14, 576.

[23]) Mestres (R.)
Note sur la composition des extraits de vanille.
Ann. Fals. Fraud. (1954), N^{os} 543 - 544, 82 - 84.

précisément à partir du caramel de glucose ou de saccharose et réduisant le réactif phosphomolybdotungstique. La formation de ce composé serait due à la dégradation des glucides pendant la préparation de la vanille. L'auteur effectue un entraînement à la vapeur d'eau de l'extrait lui-même; ainsi est éliminé ce produit gênant, contrairement à la vanilline qui n'est pas entraînable.

b) Méthodes de KRÖLLER

Plus tard, cet auteur a mis à profit la coloration rouge de la vanilline avec une solution méthanolique de pyrogallol [24]) en présence d'acide chlorhydrique concentré : pour analyser les sucres vanillés, il compare à l'œil la coloration fournie par leur produit d'extraction benzénique ou chloroformique à une gamme colorée de la même façon. Mais à cause de l'instabilité de la solution de pyrogallol, qui brunit rapidement, l'auteur l'a remplacée par une solution méthanolique d'indol [25]) de meilleure conservation; ceci améliore d'ailleurs la sensibilité du dosage, car cette nouvelle couleur rouge est plus forte. A la comparaison optique de Kröller, on peut avantageusement substituer une lecture au photomètre. Cette coloration s'est montrée très sensible, mais non spécifique puisque l'éthylvanilline, le pipéronal, l'aldéhyde p-hydroxybenzoïque et, en général, tous les aldéhydes aromatiques réagissent de façon analogue.

c) Coloration par nitrosation

Maurel [26]) a constaté qu'à pH 4 l'acide nitreux naissant colore la vanilline en jaune au bain-marie bouillant et que le maximum d'absorption est situé à 415 mμ. D'autres phénols, tels l'eugénol et l'aldéhyde anisique, subissent la nitrosation dans les mêmes conditions, mais voient leur maximum d'absorption déplacé. Pour

---

[24]) Kröller (E.)
Eine Methode zur einfachen und exakten Vanillinbestimmung in Puddingpulvern, u. s. w.
Dtsch. Lebensmitt. Rdsch. (1948), *44*, N° 7, 145 - 146.

[25]) —— ibid.
Dtsch. Lebensmitt. Rdsch (1950), *46*, N° 1, 6 - 7.

[26]) Maurel (A.)
Contribution à l'étude des extraits de vanille.
Nouvelles méthodes de dosage de la vanilline.
C. R. Acad. Agric. Fr. (1954), N° 4, 163 - 165.

Maurel, ce dosage est donc spécifique de la vanilline et de l'éthylvanilline, mais auparavant l'auteur défèque quand même par l'acétate de plomb.

Conclusion sur les dosages colorimétriques de la vanilline

La vanilline réagissant avec de très nombreux composés, on n'est pas en peine d'allonger cette liste de dosages colorimétriques. Mais la valeur finale des résultats reste, là encore, dépendante de son isolement préalable puisqu'*aucune coloration n'est vraiment spécifique*. Cependant la colorimétrie en elle-même constitue un procédé simple et assez précis, ce qui en fait la méthode la plus utilisée.

4) MÉTHODES POTENTIOMÉTRIQUES

Elles reviennent toutes à un dosage acidimétrique rendu plus précis par une mesure électrométrique.

La plupart des auteurs titrent l'acide chlorhydrique libéré après addition de chlorhydrate d'hydroxylamine et formation de l'oxime correspondant à la vanilline. Ainsi Maurel [27]) opère directement sur les extraits alcooliques de la vanille : après 30 minutes de contact avec le chlorhydrate d'hydroxylamine, il revient au pH initial du mélange en versant une solution titrée de potasse alcoolique 0,01 N; de là, il déduit la quantité d'acide chlorhydrique libéré et estime à 1 % la quantité d'oxime formée à partir du glucose. Malheureusement, il dose également tous les aldéhydes.

Woidisch et coll. [28]) suppriment l'hydroxylamine, source d'erreurs, et titrent directement la vanilline des sucres vanillés dans l'alcool à 50° G.L.; leurs courbes de titration montrent un point d'équivalence à pH 10.

---

[27]) Maurel (A.)
Contribution à l'étude de la vanille et de ses extraits : analyse-composition.
Ann. Fals. Fraud. (1954), N° 545 - 546, 181.

[28]) Woidisch (K.) Schmid (L.) Gnauer (H.)
Potentiometrische Titrationen in der Lebensmittelanalytik.
Z. Lebensm.-Untersg. u. -Forschg. (1956), *104*, N° 2, 97 - 104.

SINGH et SINGH [29]) oxydent d'abord la vanilline par la chloramine T en milieu sodique concentré avant de titrer par potentiométrie l'acide vanillique formé.

On pourrait aussi opérer ces dosages en milieu non aqueux, et MATHEWS et WELCH [30]) l'ont fait dans la n-butylamine pour plusieurs autres diphénols et les acides hydroxybenzoïques.

Conclusion sur les méthodes potentiométriques

Plus fines qu'un simple dosage acidimétrique avec indicateur coloré, les techniques potentiométriques sont pourtant perturbées par de nombreuses autres substances que la vanilline.

5) MÉTHODES POLAROGRAPHIQUES ET OSCILLOPOLAROGRAPHIQUES

Toutes deux entrent également dans la catégorie des méthodes physiques.

La détermination polarographique de la vanilline est basée sur la réduction de son groupement aldéhydique au niveau de la goutte de mercure qui sert d'électrode. On opère souvent dans une solution 0,1 M de chlorure d'ammonium. Mais en présence de fortes concentrations de sucres, on assiste au déplacement du potentiel de demi-onde vers les valeurs négatives.

HISASHI SATO [31]) prend comme solvant un alcool à 90° G.L. contenant 0,02 % de gélatine et comme électrode interne une solution d'iodure de potassium à 0,048 M. Quant à LETAW et GROPP [32]),

---

[29]) SINGH (B.) SINGH (A.)
Potentiometric studies in oxidation-reduction reactions. XVI. Oxidation with chloramine T. Determination of organic substances.
Research Bull. East Panjab Univ. (1953), N° 30, 55 - 66.

[30]) MATHEWS (D.H.) WELCH (T.R.)
Potentiometric titrations of weak acids in non-aqueous solvents. II Hydroxybenzoïc acids and dihydric phenols in n-butylamine.
J. appl. Chem. (1958), *8*, N° 11, 710 - 715.

[31]) HISASHI SATO
Polarography of vanillin and coumarin.
Eisei Shikenjo Hôkoku (1956), N° 74, 33 - 38.

[32]) LETAW (H.) GROPP (Ir. et A.H.)
Polarographic studies in non-aqueous media. I. Formamide.
J. Phys. Chem. (1953), 57, 964 - 965.

ils font leur mesure avec une électrode au calomel, mais en milieu formamide.

Woggon et coll. [33]) [34]) [35]) préfèrent le dosage oscillopolarographique de la vanilline après sa transformation en semicarbazone et Davidek [36]) trouve plus précise la polarographie de son oxime.

Ces méthodes marquent un net progrès dans le spécifité du dosage de la vanilline; mais elles nécessitent un appareillage particulier dont la mise en œuvre peut être délicate.

6) MÉTHODES SPECTROPHOTOMÉTRIQUES

Elles consistent à mesurer à des longueurs d'onde bien précises l'absorption de la vanilline ou de certains de ses dérivés.

Ainsi Sharp [37]) se place aux longueurs d'ondes suivantes pour des solutions de vanilline dans l'acide chlorhydrique 0,01 N :

2 maximums : 279 et 307,5 mμ
1 minimum : 296 mμ

En solution-tampon à pH 10,5 Way et Gailey [38]) constatent un dé-

---

[33]) Woggon (H.) Rauscher (K.)
Die quantitative oszillographische Bestimmung von Vanillin und Bourbonal in Vanillin-, Zucker-, Pudding- und Sossenpulvern.
Nahrung (1959), 3, N° 2, 161 - 173.

[34]) Woggon (H.) Rauscher (K.) Köhler (U.)
Die papier-chromatopolarographische Bestimmung von Vanillin und Äthylvanillin in Lebensmitteln.
Nahrung (1960), *4*, 374 - 389.

[35]) Woggon (H.) Köhler (U.)
Die papierchromato-oszillopolarographische Bestimmung von Vanillin und Äthylvanillin in Lebensmitteln.
Ernährungsforschung (1960), *5*, N° 4, 402 - 409.

[36]) Davideck (J.)
Polarographische Bestimmung von Vanillin.
Z. (Frsenius') anal. Chem. (1961), *179*, N° 3, 165 - 169.

[37]) Sharp (L.K.)
The assay of vanillin.
Analyst (1951), *76*, N° 901, 215 - 219.

[38]) Way (R.M.) Gailey (W.R.)
A micro method for the determination of vanillin and ethylvanillin in vanilla extract.
J. of. A.O.A.C. (1951), *34*, N° 3, 726 - 731.

placement du maximum à 347,5 mμ et dans l'alcool à 95° G.L., MAUREL et LALEMENT [39]) le situent à 278 et 312 mμ.

Quelle que soit la solution choisie, la spectrophotométrie est une méthode sensible et précise à condition que la vanilline soit pure; c'est pourquoi plusieurs auteurs, dont WAY et GAILEY [38]) la pratiquent après séparation chromatographique et élution des taches.

Dans certains cas, on ne s'adresse pas à la spectrophotométrie pour doser la vanilline pour elle-même. Ainsi MAUREL et LALEMENT [39]) s'en servent pour distinguer les extraits provenant d'une vanille Bourbon de ceux d'une vanille Tahiti. Quant à POMERANTZ et coll. [40]), ils relient leur spectrophotomètre à un tube cathodique, ce qui leur permet de faire apparaître sur l'écran le spectre continu d'un extrait entre 400 et 700 mμ; les moindres falsifications s'accompagnent de profondes modifications du tracé et sont visibles d'un seul coup d'œil.

7) DOSAGES DES GROUPEMENTS FONCTIONNELS DE LA VANILLINE

Le dosage de la vanilline ne se fait pas forcément par des méthodes physiques. On a aussi tenté de déterminer quantitativement chacun de ses groupements chimiques [41]) [42]) [43]) [44]); en réalité,

---

[39]) MAUREL (A.) LALEMENT (S.)
Etude des falsifications des extraits de vanille.
Ann. Fals. Fraud. (1952), Nos 523 - 524, 264.

[40]) POMERANTZ (R.) GOLDBLITH (S.A.) PROCTOR (E.)
Vanila evaluation. Rapid spectrophotometric technique for evaluation of vanilla extracts.
J. agric. Food Chem. (1957), *5*, No 4, 292 - 293.

[41]) LIER (H.) SCHÖNIGER (W.) SCHIVIZHOFFEN (E.)
Microchemical determination of carbonyl groups by the method of Stache-Falkenhausen.
Mikrochemie ver. Mikrochim. Acta (1950), *35*, 407 - 411.

[42]) HILLIS (W.E.)
The determination of functional groups in tannins and lignins.
I. Determination of hydroxyl groups.
J. Soc. Leather Trades' Chemists (1954), *38*, 177 - 183.

[43]) HERON (A.E.) REED (R.H.) STAGG (H.E.) WATSON (H.)
Critical study of the determination of methoxyl groups.
Analyst (1954), *79*, 671 - 680.

[44]) STEYERMARK (A.) LOESCHAUER (E.E.)
Microanalytical determination of acetyl and alkoxyl groups.
J. of A.O.A.C. (1954), *37*, 443 - 449.

ces méthodes ne sont vraiment intéressantes que si la vanilline prédomine dans l'échantillon et si celui-ci est de quelques mg au moins.

8) DOSAGES PARTICULIERS APRÈS CHROMATOGRAPHIE OU ÉLECTROPHORÈSE

Après chromatographie, on effectue parfois l'évaluation planimétrique des taches que l'on compare à une gamme de taches-étalons, mais pour cela les spots doivent être ronds et bien délimités; or c'est assez rare, surtout sur papier. Il est possible également de faire un relevé densitométrique des taches après révélation et d'en déduire la concentration par intégration de la courbe obtenue avec l'échantillon et les étalons. Saarnio et coll. [45]) photographient le chromatogramme où ils ont fait migrer inconnus et standards, puis procèdent à l'évaluation photométrique du noir photographique. Après ionophorèse, Peniston et coll. [46]) présentent directement le tube contenant le gel d'agar-agar qui a servi à la séparation, à une source de rayons ultra-violets et mesurent leur absorption pour identifier et doser les produits isolés, dont la vanilline.

CONCLUSION SUR LES DOSAGES DE LA VANILLINE

Devant le grand nombre de méthodes possibles, un choix s'impose; car aucune technique ne réunit tous les avantages et surtout pas celui d'être universelle. Donc, à valeur égale, on choisira le procédé à employer en fonction du milieu dans lequel on veut doser la vanilline, de la concentration de celle-ci et de l'appareillage dont on dispose.

---

[45]) Saarnio (J.) Niskasaari (E.) Gustafsson (C.)
Quantitative paper chromatography of monosaccharides and some aromatic compounds.
Suomen. Kemistileki (1952), 25 B, 25 - 29.

[46]) Peniston (Q.P.) Agar (H.D.) McCarthy (J.L.)
Ionophoretic analyses in agar gels.
Anal. Chem. (1951), 23, 994 - 999.

DEUXIÈME PARTIE

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Après avoir consulté les principaux travaux concernant la vanille et la vanilline, nous avons constaté qu'il n'existait pas de méthode à la fois spécifique, assez simple et rapide, ne nécessitant pas d'appareillage trop particulier et capable de déterminer avec une précison suffisante le taux de vanilline dans les produits alimentaires.

La plupart du temps, le dosage est perturbé par des composés naturels ou frauduleux qui n'ont pas entièrement été éliminés. Aussi avons-nous recherché d'abord une technique permettant une séparation parfaite de la vanilline de toutes les substances pouvant influer sur son dosage ultérieur. Puis il a fallu trouver un dosage utilisable à la suite de la technique d'isolement choisie. Enfin, nous avons essayé d'étendre la méthode à des composés autres que la vanilline et de l'appliquer à divers produits alimentaires. C'est donc dans cet ordre que nous allons exposer notre travail expérimental :

ch. 1 : Séparation de la vanilline.

ch. 2 : Dosage de la vanilline.

ch. 3 : Extension de la méthode.

ch. 4 : Application à divers produits alimentaires.

Chapitre Premier

SÉPARATION DE LA VANILLINE

Parmi toutes les méthodes de séparation de la vanilline, les meilleures relèvent, comme nous l'avons vu [1]), de la chromatographie. Et dans celles-ci, notre choix s'est porté sur la *chromatographie en couche mince* à cause de sa rapidité d'exécution et de sa meilleure sensibilité.

En pratique, nous procédons de la manière suivante :

Préparation des plaques

Mis à part quelques modifications de détail, nous opérons comme le recommande STAHL [2]) : pour 5 plaque de 20 cm × 20 cm, on prend 30 g de Kieselgel G ou GF_{254} selon STAHL [3]); on verse la poudre dans un erlenmeyer contenant 70 ml d'eau distillée et on agite environ 30 secondes à la main ou à l'agitateur mécanique pour disperser tout grumeau. Sur cinq plaques disposées horizontalement l'une à la file de l'autre, on étale le gel à l'aide d'un étaleur [4]) dont l'épaisseur est réglée sur 0,25 mm. Cette dernière opération doit être terminée avant la prise du plâtre, c'est-à-dire dans les 2 minutes qui suivent l'introduction du Kieselgel dans

---

[1]) Voir le chapitre sur l'isolement de la vanilline dans la première partie de ce travail.

[2]) STAHL (E.)
Dünnschicht-Chromatographie.
Springer-Verlag (1962).

[3]) Fabriqué par Merck (Darmstadt).

[4]) Pour nos expériences, nous avons toujours utilisé l'étalateur DESAGA (Heidelberg).

l'eau. Après séchage à l'air libre, on active à l'étuve 30 minutes à 120° C. Une fois refroidies, les plaques sont conservées à l'abri de l'humidité dans une enceinte hermétique contenant du Silicagel bleu qu'on réactive dès qu'il passe au rose. Si une plaque a pris de l'humidité, on peut sans inconvénient la réactiver comme précédemment.

Solvants

Parmi les nombreux solvants essayés, nous nous sommes surtout intéressé aux solvants A, B et C de SUNDT et SACCARDI [5]). Malheureusement, les solvants A et B ne séparent pas la vanilline de l'aldéhyde p-hydroxybenzoïque. Donc ils sont inutilisables si on veut doser la vanilline dans la vanille ou un produit vanillé puisque ces deux composés y sont normalement présents. Cependant, pour analyser un arôme artificiel, le solvant B constitué de :

hexane	72 ml
acétate d'éthyle	28 ml

donne des spots bien ronds et nettement séparés pour la vanilline, l'éthylvanilline, le pipéronal et le vanitrope. Le solvant C nous a montré des traînées d'un cm; aussi l'avons-nous modifié en augmentant la proportion initiale d'acétate d'éthyle. Finalement, le mélange

chloroforme	98 ml
acétate d'éthyle	12 ml

permet de séparer tous les composés voisins de la vanilline; néanmoins les aldéhydes anisique et vératrique sont très rapprochés puisque leur R_F respectif est 0,88 et 0,86. Il faut noter que ce dernier solvant donne des R_F assez élevés, mais fournit des renseignements équivalents, sinon meilleurs que ceux obtenus avec le solvant B de SUNDT et SACCARDI. Il est bon d'ailleurs d'avoir à sa disposition plusieurs solvants qui permettent de vérifier l'un par l'autre. C'est l'usage que nous en faisons.

---

[5]) SUNDT (E.) SACCARDI (A.)
Thin-layer chromatography and paper chromatography of vanilla flavoring compounds.
Food Technol. (1962), *16*, N° 4, 89 - 91.

Mais nous considérons comme le meilleur de tous le mélange de PASTUSKA [6]; il est constitué de :

benzène	95 ml
méthanol	5 ml

Comme le montre le chromatogramme de la **figure 1**, la tache la plus voisine de la vanilline est celle de l'isovanilline; or ce dernier composé n'existe pas dans la nature et, son prix de revient étant nettement plus élevé que celui de la vanilline, on peut le considérer comme une fraude improbable. Par contre, toutes les autres taches sont nettement séparées : de là notre préférence. On n'observe aucune traînée et les spots restent bien ramassés.

Les produits entrant dans la confection de la phase mobile doivent être aussi purs que possible : nous employons le méthanol Merck ou RP, le chloroforme RP et l'acétate d'éthyle Merck ou RP; quant à l'hexane, souvent difficile à obtenir anhydre, nous le rectifions, ainsi que le benzène, sur une colonne assez longue pour éliminer toutes les impuretés et nous rejetons la tête et la queue (chacune d'environ 1/5^{e} du volume en cours de distillation).

Le mélange des constituants de la phase mobile est effectué très soigneusement dans la cuve elle-même. 100 ml environ sont nécessaires pour une migration, qu'il y ait une ou deux plaques dans la cuve. Il est conseillé de ne pas se servir du même solvant une deuxième fois.

Quantités déposées

Le produit à expertiser doit au préalable se trouver en solution. Et, si on veut obtenir des spots ronds et bien ramassés, la quantité optimale à déposer sur la plaque pour identifier la vanilline et les aldéhydes aromatiques voisins est de 1 à 2 µg de chaque [7].

Pour faciliter et accélérer le dépôt des taches, on a intérêt à choisir, quand cela est possible, des solvants très volatils : toluè-

---

[6]) PASTUSKA (G.)
Z. Analyt. Chem. (1961), *179*, 355.
Cité dans les livres (« Dünnschrift-Chromatographie ») de :
RANDERATH (K.), p. 175, de
STAHL (E.), p. 199.

[7]) Pour le dosage, la quantité à déposer dépend de la sensibilité de la méthode choisie : nous verrons plus loin qu'elle doit être un peu plus élevée.

ne, benzène, chloroforme par exemple. Mais, dans tous les cas, il est indispensable de déposer au moins une tache-témoin de la substance à repérer et toute une gamme si on veut procéder au dosage.

Migration

A température ordinaire, une migration du front de 10 cm au-dessus de la ligne de départ dure à peu près 30 minutes. Puis, on sèche la plaque à l'air libre ou par un courant d'air froid jusqu'à disparition de toute odeur de solvant.

Révélation

Comme il n'existe pas de réactif spécifique de la vanilline, on s'adresse surtout à divers réactifs de sa fonction aldéhydique qu'on pulvérise sur la plaque. Parmi les plus employés, la *2-4 dinitrophénylhydrazine* révèle la vanilline en orange, mais le fond devient jaune. La *benzidine chlorhydrique* ne présente pas cet inconvénient et permet aisément de voir coloré en jaune 0,5 µg de vanilline après migration; le fond reste blanc. Si ensuite on expose la plaque révélée aux rayons ultra-violets, la limite de sensibilité est encore abaissée; la vanilline présente alors une couleur brun-vert. Avec le *sulfate d'hydrazine* en solution chlorhydrique, les aldéhydes deviennent jaunes à orangés, mais aux rayons ultra-violets, la vanilline montre une fluorescence à reflets bleutés.

Evidemment, ces révélateurs colorent aussi les autres aldéhydes éventuellement présents, ce qui permet la mise en évidence simultanée de la vanilline, des aldéhydes p-hydroxybenzoïque, anisique, protocatéchique et vératrique, de l'éthylvanilline et du pipéronal, mais pas de la coumarine, ni du vanitrope (parce que non aldéhydiques).

Si on a pris comme support le Kieselgel GF_{254}, il est possible de détecter la vanilline par la seule exposition aux *rayons ultra-violets;* en effet, elle apparaît comme une tache sombre sur le fond fluorescent du gel et 2 µg sont facilement repérables dans ces conditions.

Notre préférence, comme celle de nombreux auteurs, est allée à la *benzidine chlorhydrique* ou au *sulfate d'hydrazine,* cha-

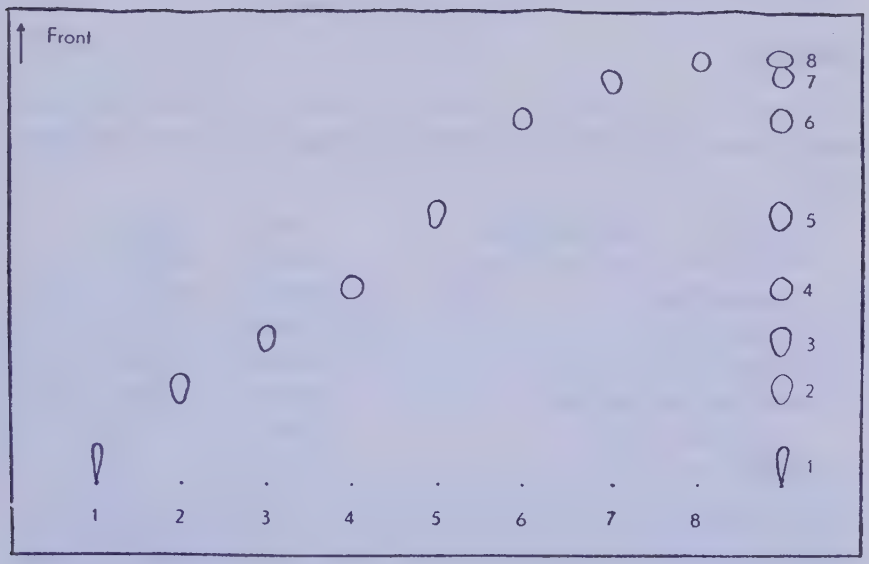


Fig. 1 - Chromatographie en couche mince sur Kieselgel G ou GF avec le solvant benzène / méthanol (95/5)

1 : Aldéhyde protocatéchique
2 : Aldéhyde p-hydroxybenzoïque
3 : Isovanilline
4 : Vanilline
5 : Ethylvanilline
6 : Aldéhyde vératrique
7 : Aldéhyde anisique
8 : Pipéronal

cun *associé aux rayons ultra-violets*, quand on effectue la recherche qualitative de la vanilline. Mais avant son dosage quantitatif, nous la repérons seulement par son *absorption des rayons ultra-violets* sur Kieselgel GF_{254}.

Résultats

Le solvant benzène / méthanol (95/5 v/v) donne un chromatogramme semblable à celui de la **figure 1,** ce qui correspond aux R_F suivants :

Aldéhyde protocatéchique	0,08	(0,06)
Aldéhyde p-hydroxybenzoïque	0,21	(0,17)
Isovanilline	0,31	(0,23)
Vanilline	0,42	(0,27)
Ethylvanilline	0,58	
Aldéhyde vératrique	0,78	(0,45)
Aldéhyde anisique	0,86	
Pipéronal	0,90	

Entre parenthèses, nous avons mis, à titre de comparaison, les chiffres indiqués dans l'ouvrage de Stahl : ils différent sensiblement parce que l'épaisseur de couche utilisée n'est pas la même que la nôtre.

Avantages de cette méthode de séparation

La chromatographie en couche mince avec le solvant benzène / méthanol permet l'isolement de la vanilline dans un temps bien inférieur aux 24 heures des techniques par précipitation et extraction ou même par chromatographie sur papier. D'autre part, cette méthode, qui s'effectue sur une prise d'essai réduite, s'est montrée fidèle et sûre grâce au dépôt d'une tache de vanilline pure comme témoin. Sa sensibilité reste supérieure à n'importe quelle autre, y compris celle des techniques sur papier. Aussi est-il possible de l'utiliser pour détecter dans les meilleures conditions la vanilline dans tous les produits [8]), au besoin après une extraction, même non spécifique.

Enfin, cette méthode parfaitement sélective peut être suivie d'un bon dosage à condition d'observer quelques précautions.

[8]) Voir plus loin au chapitre des applications aux produits alimentaires.

Chapitre 2

DOSAGE DE LA VANILLINE

La quantité optimum de vanilline à déposer sur la plaque étant de 1 à 2 µg, il fallait obligatoirement mettre en œuvre un dosage suffisamment sensible et précis et qui soit compatible avec l'excellente méthode d'isolement par chromatographie en couche mince.

Comparer directement sur le chromatogramme l'intensité de coloration ou de fluorescence d'un inconnu à une gamme de spots connus, ne nous a pas paru assez précis. Nous avons renoncé pour les mêmes raisons aux méthodes planimétriques et opacimétriques habituellement employées pour les dosages sur la plaque elle-même; d'ailleurs elles nécessitent un appareillage qui peut ne pas se trouver dans un laboratoire d'analyses courantes. D'autre part, les méthodes pondérales ou volumétriques étant exclues à cause de leur faible sensibilité, nous avons pensé à la spectrophotométrie, à la fluorescimétrie et à la colorimétrie. La spectrophotométrie est assez sensible et précise, mais les résultats sont trop facilement influencés par des traces d'impuretés. La fluorescimétrie ne nous a pas fourni à ce jour de méthode utilisable malgré de très nombreux essais. Aussi avons-nous opté pour la colorimétrie facilement praticable dans tout laboratoire.

Sachant qu'on dose de très faibles quantités de métabolites de l'adrénaline et de la noradrénaline après leur oxydation en vanilline, nous avons finalement retenu l'une de ces méthodes à cause de sa sensibilité, de sa simplicité et de sa sûreté, pour l'adapter à nos besoins. Elle est basée sur la belle *coloration rouge de la vanilline et de l'indol en milieu sulfurique.*

Cette réaction est connue depuis fort longtemps puisqu'en

1866 BAEYER [1]) signalait déjà qu'un copeau de bois de pin humecté d'acide chlorhydrique donnait avec l'indol une coloration rouge cerise : or on sait depuis que la liguine du bois se décompose par hydrolyse en nombreux sous-produits, dont 20 % environ de vanilline. Plus tard, KRÖLLER [2]) a utilisé cette même coloration avec l'indol pour un dosage colorimétrique en tubes : il opérait en comparant à l'œil le tube inconnu à une gamme comprenant des quantités croissantes de vanilline. Mais, l'indol se colore aussi avec une foule d'autres composés; les aldéhydes voisins de la vanilline montrent tous des teintes analogues.

ADAPTATION DE LA MÉTHODE DE GIUDICELLI-DAUCHY

Au début de nos recherches sur la coloration Vanilline-Indol, nous sommes partis du mode opératoire de GIUDICELLI-DAUCHY [3]) qui préconisent d'ajouter dans l'ordre :

solution de vanilline en milieu carbonaté	3 ml
acide sulfurique RP	0,6 ml
acide phosphorique RP	4 ml
indol (solution alcoolique à 0,5 %)	0,2 ml
total des volumes :	7,8 ml

et de lire au spectrophotomètre après 4 minutes en cuves de 20 mm à 495 mμ.

Puis, nous avons étudié l'influence respective de divers facteurs sur la coloration afin de déterminer les conditions de son

---

[1]) BAEYER
Liebig's Annalen der Chemie (1866), *140*, 296.

[2]) KRÖLLER (E.)
Eine Methode zur einfachen und exakten Vanillinbestimmung in Puddingpulvern, u. s. w.
Lebensmitt. Rdsch. (1950), *46*, N° 1, 6 - 7.

[3]) GIUDICELLI (J.F.) DAUCHY (F.)
Dosage colorimétrique du bloc m-0-méthyladrénaline + m-0-méthylnoradrénaline dans l'urine.
Bull. Soc. Chim. Biol. (1963), *45*, N° 910, 1043 - 1049.

intensité maximale. Mais nous avons réduit les volumes à 3,4 ml et opéré en cuves de 10 mm d'épaisseur.

Influence de l'alcool

Dès l'abord, nous avons remplacé la solution alcoolique d'indol par une solution acétique afin d'éliminer l'alcool de la réaction. Nous avons en effet vérifié l'observation de Rosenthaler et Vegezzi [4]) qui signalent que la vanilline donne avec l'alcool éthylique, dans les conditions mêmes de la réaction étudiée, une coloration allant du vert-clair au vert-brun selon la quantité d'acide sulfurique; de là, il résulte une bande d'absorption dans le rouge-orangé.

De plus, l'addition des acides dans l'eau provoquant une forte élévation de température (parfois autour de 80° C), on peut craindre une évaporation de l'alcool, surtout si on dissout aussi la vanilline dans ce solvant.

Toujours est-il que nous avons trouvé parfois des écarts entre deux tubes préparés à partir des mêmes solutions de façon rigoureusement semblable et ceci lorsqu'ils contenaient de l'alcool. Cette constatation nous a paru suffisante pour éliminer toute trace de n'importe quel alcool et veiller à ce que l'évaporation du méthanol soit complète après migration.

Influence de l'ordre d'introduction des réactifs

L'ordre d'introduction des réactifs n'intervient pratiquement pas sur l'intensité de la coloration et il en est de même si on mélange les deux acides pour les verser en une fois.

Importance de la viscosité du milieu réactionnel

Les essais précédents nous ont montré que le milieu réactionnel était très visqueux, principalement à cause de la forte proportion d'acide phosphorique concentré. Or nous voulions effectuer la réaction colorée directement sur le Kieselgel retenant la vanilline après migration sur plaque, puis centrifuger avant de lire au spectrophotomètre. Aussi avons-nous essayé de centrifuger une

---

[4]) Rosenthaler (L.) Vegezzi (G.)
Über Farbenreaktionen von Alkoholen.
Mitt. Lebensm. Hyg. (1952), *43*, 370 - 388.

petite quantité de Kieselgel introduit arbitrairement dans le tube-réaction avant même de connaître son influence sur la coloration; nous avons constaté qu'il s'avérait très difficile de faire sédimenter le gel. C'est pourquoi nous avons changé l'acide phosphorique contre l'acide sulfurique concentré : pratiquement la densité optique est restée la même, mais la centrifugation en est facilitée.

Longueur d'onde du maximum d'absorption

Afin de savoir à quelle longueur d'onde opérer nos mesures, nous avons recherché le maximum d'absorption. La coloration a été obtenue à partir de 11 µg de vanilline, ce qui correspond à une solution environ 1/15.000e M. Puis entre la 10e et la 25e minute, nous avons mesuré son absorption dans le visible entre 400 et 600 mµ sous une épaisseur de 10 mm. Cela nous a permis de tracer le spectre de la **figure 2.** Le maximum se situe à 510 mµ.

Influence de la quantité relative des acides acétique et sulfurique

Dans chaque tube, on met une quantité fixe de vanilline et d'indol :

solution aqueuse de vanilline à 5 µg/ml	1 ml
solution acétique d'indol à 0,5 %	0,2 ml

Et on fait varier les proportions relatives de l'acide acétique et de l'acide sulfurique qui remplace l'acide phosphorique. Mais on veille à ce que le volume final reste le même partout. En lisant à 510 mµ après 10 minutes la coloration rouge contre un blanc sans vanilline, on obtient :

Tube N°	1	2	3	4	5
acide sulfurique RP . .	0,4 ml	0,6	1	1,5	1,9
acide acétique RP . . .	1,8 ml	1,6	1,2	0,7	0,2
D.O. à 510 mµ	0,18	0,34	0,38	0,40	jaune

La quantité relative acide acétique / acide sulfurique du tube n° 4 donne la plus forte densité optique et s'avère être très proche de 1/2, proportion que nous conserverons dans les expériences suivantes.

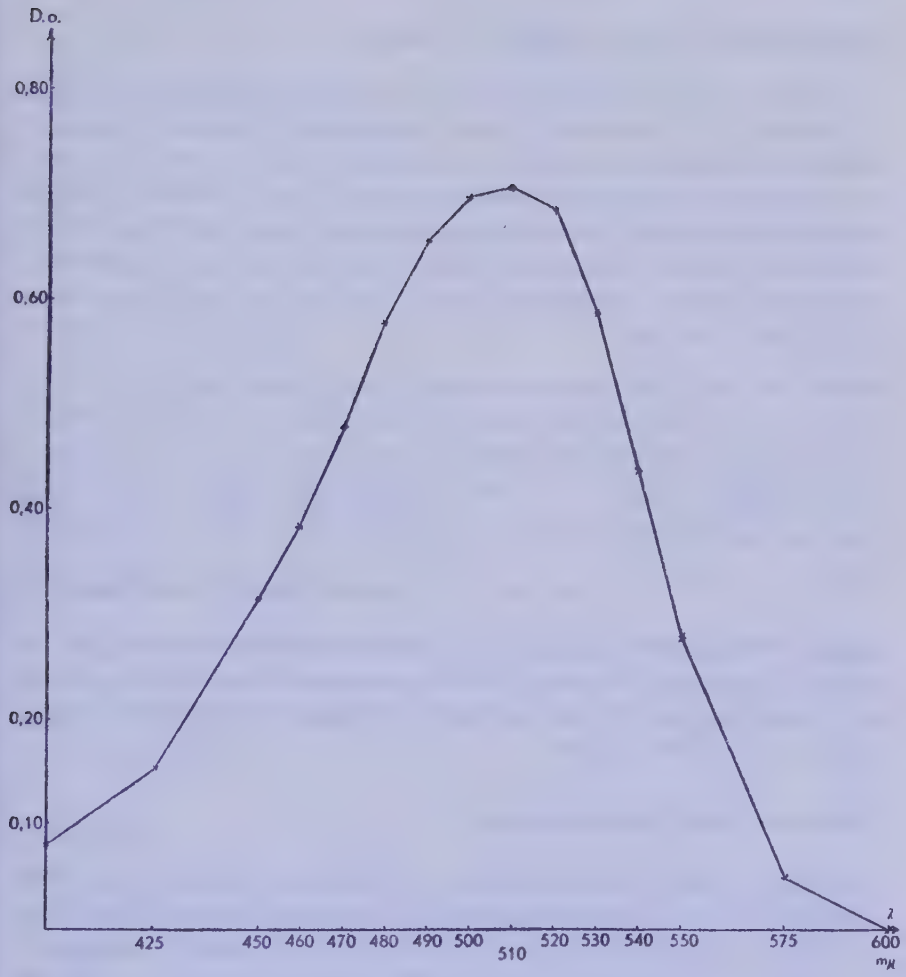


Fig. 2 - Spectre d'absorption de la coloration Vanilline-Indol.

Afin de simplifier la distribution, nous versons en une fois les acides acétique et sulfurique mélangés au préalable : la densité optique ne s'en trouve pas modifiée.

Influence de la concentration en indol

Pour déterminer l'influence de la concentration de l'indol sur l'intensité de la coloration finale, nous avons conservé la proportion optimale acide acétique / acide sulfurique à peu près égale à 1/2, mais nous tenons compte du fait que la solution d'indol ajoutée en quantité croissante apporte de l'acide acétique. Nous avons effectué la distribution suivante et lu chaque fois la densité optique à 510 mμ 10 minutes après l'addition de l'indol contre un blanc sans vanilline :

Tube N°	1	2	3	4	5
solution aq. de vanilline à 5 μg/ml .	1 ml	1	1	1	1
acide acétique RP	0,8 ml	0,7	0,6	0,4	0,1
acide sulfurique RP	1,5 ml	1,5	1,5	1,5	1,5
sol. acétique d'indol à 0,5% . . .	0,1 ml	0,2	0,3	0,5	0,9
D.O. lue à 510 mμ	0,40	0,44	0,46	0,46	0,48

Nous avons retenu le tube n° 3 comme optimum parce que le témoin correspondant est moins jaune que les suivants : nous prendrons donc 0,3 ml de la solution acétique d'indol à 0,5 % ce qui équivaut à 15 μg d'indol.

Influence de la quantité d'eau

Dans cette expérience, les quantités de vanilline et d'indol demeurent fixes, mais on fait varier le volume d'eau distillée tout en maintenant constante la proportion acide acétique / acide sulfurique = 1/2. Le volume final doit rester de 3,4 ml. On lit la densité optique, comme précédemment, après 10 minutes à 510 mμ contre un blanc des réactifs sans vanilline. Les résultats sont consignés dans le tableau ci-après :

Tube N°	1	2	3	4	5
sol. aq. de vanilline à 5 µg/0,1 ml	0,1 ml	0,1	0,1	0,1	0,1
eau distillée	0,3 ml	0,6	0,9	1,2	1,5
acide acétique RP	0,9 ml	0,8	0,7	0,6	0,5
acide sulfurique RP	1,8 ml	1,6	1,4	1,2	1
sol. acétique d'indol à 0,5% . . .	0,3 ml	0,3	0,3	0,3	0,3
D.O. lue à 510 mµ	jaune	0,36	0,37	0,37	0,32

De là, il ressort que le volume de 1 ml d'eau distillée était le plus judicieux, mais il peut varier légèrement sans diminuer la densité optique, pourvu que le volume final de la réaction reste identique.

Influence du Kieselgel

Quand on ajoute à des tubes préparés comme le n° 3 précédent, avant ou après le développement de la coloration, n'importe quelle quantité de Kieselgel G ou GF_{254} et qu'on centrifuge, il ne se produit aucun changement dans la densité optique. Donc le gel n'absorbe ni n'exhalte la coloration rouge obtenue.

Influence de la température

Le fait de placer les tubes-réactions au bain-marie bouillant pendant des temps allant de 1 à 10 minutes n'ajoute rien à l'intensité de la coloration, mais influe visiblement sur sa vitesse de développement.

Remarques

Les densités optiques de chacune des expériences précédentes ne sont pas vraiment comparables entre elles, mais seulement dans le cadre de chacun des essais, d'abord pour une question de blanc : nous avons toujours préparé un témoin sans vanilline, semblable à chaque tube en expérience. A cela s'ajoutent de légers écarts pouvant provenir, soit de la préparation quotidienne des solutions-étalons de vanilline, soit de faibles erreurs de lecture.

En résumé, les conditions expérimentales les plus favorables à l'obtention d'une bonne coloration Vanilline-Indol consistent donc à mettre en présence de la *vanilline pure* les réactifs suivants :

eau distillée	1 ml
acide acétique RP	0,7 ml
acide sulfurique RP	1,4 ml
solution acétique d'indol à 0,5 %	0,3 ml

Comme on le voit, les différences avec la méthode de Giudicelli et Dauchy sont appréciables.

Vitesse de développement de la coloration

Nous avons mesuré, de 30 secondes en 30 secondes, la densité optique de la coloration fournie par 11 µg de vanilline contre un blanc des réactifs sans vanilline; d'où la courbe de la **figure 3.**

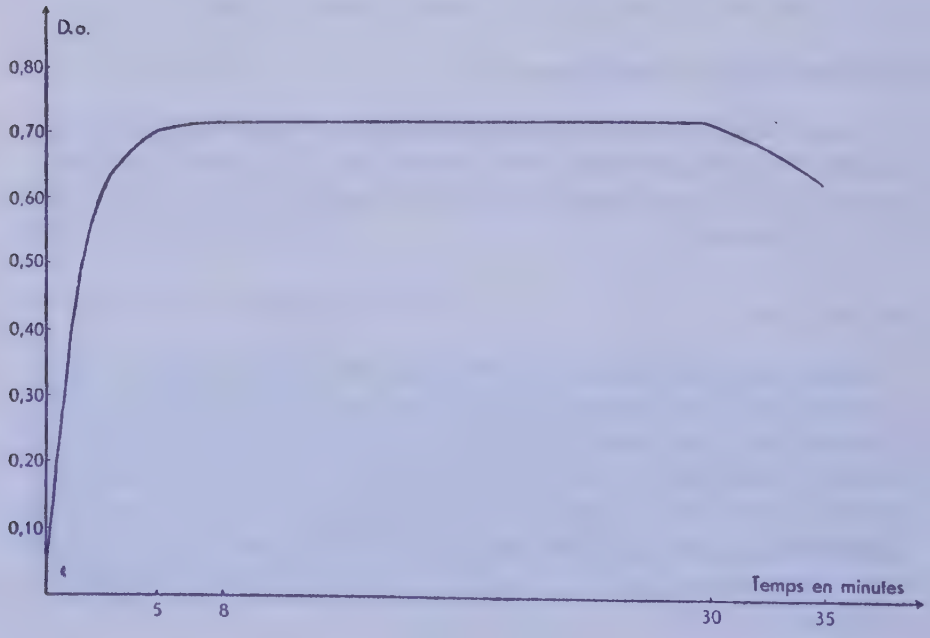


Fig. 3 - Vitesse de développement de la coloration Vanilline-Indol.

Pratiquement, la coloration est stable de 8 à 30 minutes, durée pendant laquelle devra obligatoirement s'effectuer la lecture au spectrophotomètre.

Il est à noter que la coloration se stabilise plus tôt si on ajoute la solution d'indol quand le tube est encore chaud à cause de l'addition très récente de l'acide sulfurique. Mais, si on verse le mélange froid des réactifs, on obtient la courbe de la figure 3. En tout cas, il ne faut pas plus de 8 minutes pour permettre à la coloration de se stabiliser.

Vérification de la loi de Beer-Lambert

Nous faisons la distribution suivante qui, sous un même volume, donne des quantités de vanilline variant de 0 à 16 µg dans la prise d'essai, et on lit la densité optique à 510 mµ après 10 minutes contre le tube 0 :

Tube N°	0	1	2	3	4	5	6	7	8
sol. aq. vanilline 20 µg/ml .	0 ml	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8
eau distillée	1 ml	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2
mélange acétosulfurique (1 vol. + 2 vol.)	2,1 ml	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1
sol. acét. indol. 0,5% . . .	0,3 ml	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
quantité correspondante de vanilline en µg	0	2	4	6	8	10	12	14	16
D.O. lue à 510 mµ	0	0,13	0,28	0,415	0,55	0,71	0,87	1,05	1,6

Puis on trace la courbe de la variation de la densité optique en fonction de la concentration de la vanilline : sur la **figure 4**, on observe que cette courbe est pratiquement **droite** pour une concentration de vanilline allant de **0 à 10** µg; c'est dans ces limites que la loi de Beer-Lambert est respectée et que la coloration Vanilline-Indol est utilisable pour le dosage.

Calcul du coefficient d'extinction

Le coefficient d'extinction ε de la combinaison Vanilline-Indol à 510 mµ se calcule selon la formule générale :

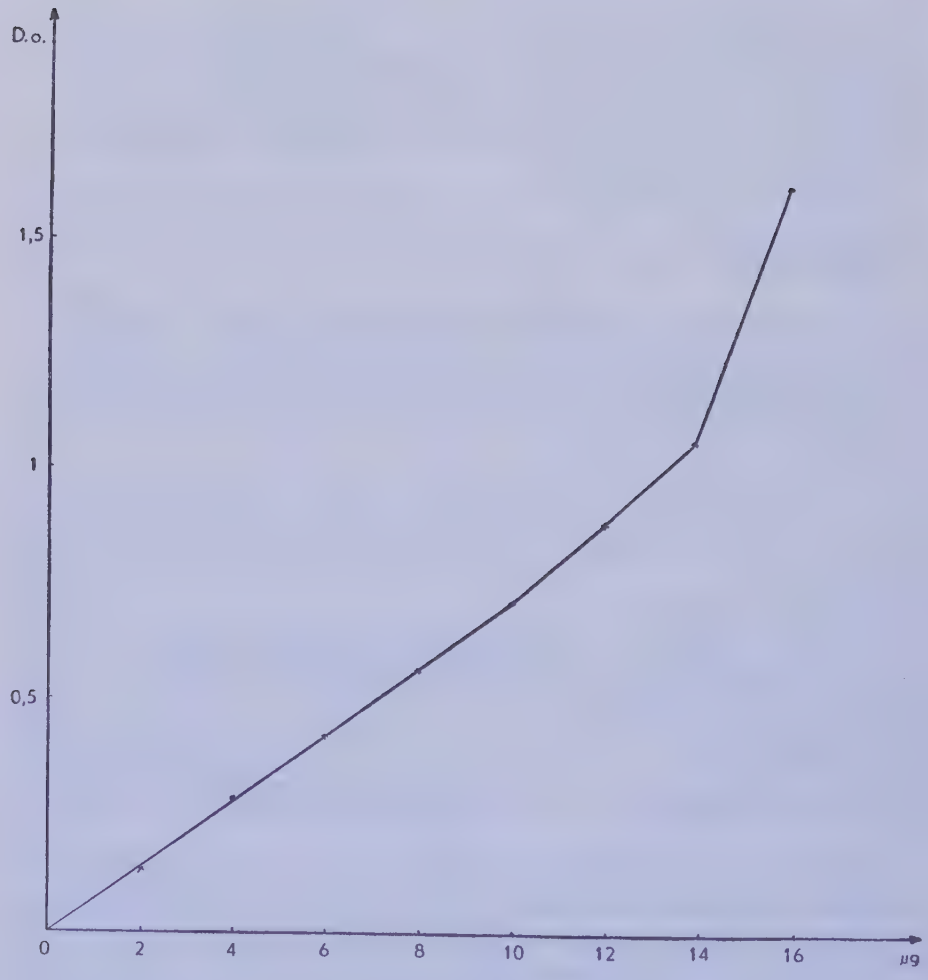


Fig. 4 - Variation de la coloration Vanilline-Indol en fonction de la concentration en vanilline.

$$\varepsilon = \frac{D.o.}{c \times l}$$

si D. o. = densité optique
c = concentration moléculaire
l = épaisseur (en cm) sous laquelle on lit la coloration

Or ne connaissant pas le poids moléculaire de la combinaison et en admettant qu'il y entre toujours la même proportion d'indol, nous avons calculé ε en faisant c égal à la concentration moléculaire en vanilline.

Pour 11 µg/ml de vanilline, sachant que son poids moléculaire est 152,

$$c = \frac{1 \times 11}{15{,}2 \times 10^4} = 0{,}723 \times 10^{-4}$$

$$\text{d'où } \varepsilon = \frac{0{,}71}{0{,}723 \times 10^{-4}}$$

$$\text{donc à 510 m}\mu\text{ : } \varepsilon = \boxed{0{,}995 \times 10^4}$$

Conclusion :

En possession d'une bonne technique de séparation de la vanilline par chromatographie en couche mince et ayant déterminé les meilleures conditions expérimentales pour réaliser le dosage colorimétrique de ce composé, rien ne s'opposait plus à la réalisation de ce dosage après migration sur plaque. Pour nous résumer, nous exposerons l'enchaînement de ces deux méthodes sous forme de **fiche technique.**

FICHE TECHNIQUE DU DOSAGE DE LA VANILLINE
après isolement par chromatographie en couche mince

Réactifs

— Solution-étalon fraîchement préparée de vanilline pure Prolabo à 0,5 ‰ dans un solvant volatil tel que benzène, toluène ou chloroforme.

— Durée de conservation : 2 heures —

— Solution acétique d'indol à 0,5 %

— Mélange acétosulfurique (quantité nécessaire pour 1 tube)

acide acétique RP	0,7 ml
acide sulfurique RP	1,4 ml

— Benzène rectifié

— Méthanol Merck ou RP.

Chromatographie en couche mince

Sur une plaque de 20 cm × 20 cm portant une épaisseur de 0,25 mm de Kieselgel GF_{254} activé, on détermine la ligne de départ à 1,5 cm du bord inférieur. A partir du 4e cm du bord latéral gauche, nous déposons, de 2 cm en 2 cm, une quantité croissante de la solution-étalon fraîche de vanilline et deux taches de l'inconnu; pour cela, on remplit une micropipette de précision avec le volume exact à déposer en veillant à son écoulement lent mais total; si on opère sous un courant d'air froid, on active l'évaporation du solvant, ce qui permet d'obtenir des taches de faible diamètre, favorables à une bonne migration. Pratiquement, nous déposons :

au point 4 cm :	2 µl correspondant à 1 µg de vanilline
au point 6 cm :	4 µl correspondant à 2 µg de vanilline

au point 8 cm : 6 µl correspondant à 3 µg de vanilline
au point 10 cm : 8 µl correspondant à 4 µg de vanilline
au point 12 cm : 10 µl correspondant à 5 µg de vanilline
aux points 14 et 16 cm : 2 taches de l'inconnu.

Un essai préliminaire permettra de déposer une quantité comprise entre 1 et 5 µg. Il vaut mieux, en effet, ne pas dépasser 5 µg de vanilline pour éviter l'effet de traînée dû à une saturation locale du gel. On peut supprimer la tache-étalon de 4 µg et la remplacer par un « recovery ».

Dans la cuve à chromatographie, nous mélangeons directement :

benzène rectifié	95 ml
méthanol RP	5 ml

Puis, on laisse migrer jusqu'à ce que le front du solvant atteigne 10 cm au-dessus de la ligne de départ, ce qui demande 25 à 30 minutes environ. Aussitôt, on sort la plaque et on la sèche soigneusement à l'air libre ou sous courant d'air froid. Grâce à une forte source de rayons ultra-violets, nous localisons les taches sombres dues à la vanilline et nous prenons un repère à 3 mm au-dessus de ces taches. Par le repère on fait passer une ligne parallèle à celle de départ, et, à partir de 1 cm du bord latéral gauche, nous traçons avec une pointe sèche une marque tous les 2 cm. On procède de même sur une ligne située à 2 cm en dessous de la précédente. On obtient ainsi des carrés de 2 cm de côté qui renferment chacun une tache de vanilline (invisible à l'œil), sauf le premier à gauche qui servira de blanc.

Il s'agit alors de gratter proprement et complètement le gel du premier carré et de le rassembler en un petit tas qu'on recouvre avec un tube à extrémité rodée; puis on applique fortement le tube sur la plaque avant de retourner tube et plaque en évitant toute perte de gel. On procède de même pour le carré voisin et ainsi de suite.

Il ne reste qu'à verser sur le gel :

1 ml d'eau distillée
2,1 ml du mélange acétosulfurique
0,3 ml de la solution acétique d'indol.

On agite pour bien mélanger le gel et on centrifuge 10 à 15 minutes à 3000 t/min. Il faut ensuite prélever avec soin le liquide surnageant sans aspirer de gel et transvaser dans des cuves de verre de 10 mm d'épaisseur. Enfin, on lit au spectrophotomètre à 510 mμ afin de tracer la courbe-étalon en inscrivant en abscisse les concentrations et en ordonnée les densités optiques. Comme le montre la **figure 5,** on obtient une **droite** d'après laquelle on déduit, par interpolation, la valeur de l'inconnu en prenant la moyenne des deux chiffres trouvés.

DISCUSSION DE LA MÉTHODE

Sensibilité : Cette méthode s'est confirmée comme étant très sensible puisqu'elle permet d'opérer sur des quantités de vanilline de l'ordre du μg.

Sécurité : Le repérage des taches de vanilline aux rayons ultra-violets évite toute erreur de localisation; il ne serait pas prudent, en effet, de se baser uniquement sur le R_F de la vanilline, car celui-ci peut varier sensiblement avec l'épaisseur du gel, le degré de saturation de l'atmosphère de la cuve, une absorption d'humidité accidentelle du gel, la présence de certaines autres substances dans le solvant ou le produit à expertiser.

De plus, il faut refaire une gamme sur chaque plaque avec une solution fraîche de vanilline dont on a contrôlé au préalable la pureté par chromatographie en couche mince; en effet, les solutions-étalons de vanilline s'altèrent en 2 à 3 heures aux concentrations que nous utilisons. D'autre part, durant la migration, il se perd environ 20 % de la vanilline, mais cette quantité varie avec l'épaisseur du gel et la distance de migration. Donc, l'exactitude du dosage exige qu'on effectue chaque fois une gamme dans des conditions identiques au dosage.

Par ailleurs, il est bon de s'assurer de la bonne marche des opérations en faisant un « recovery » (volume connu de l'inconnu + quantité connue de vanilline pure); par là, on contrôle qu'on retrouve bien la surcharge qu'on y a mise. Enfin le double dosage apporte une garantie supplémentaire puisqu'il doit permettre de

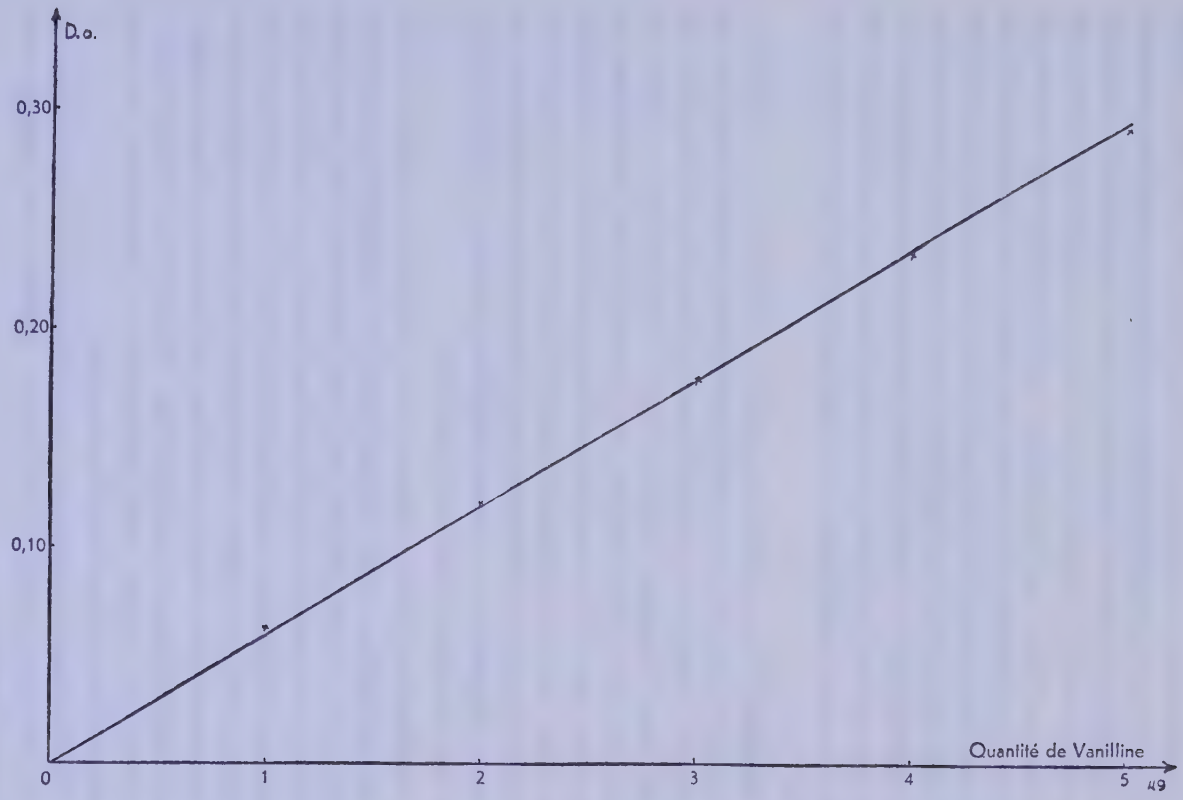


Fig. 5 - Dosage colorimétrique de la Vanilline après chromatographie en couche mince.

trouver pour l'inconnu deux chiffres très voisins entre eux, sinon identiques.

Précision : Elle dépend en grande partie de celle de la micropipette servant au dépôt des taches et ensuite des performances du spectrophotomètre [5]). Avec une bonne balance et un matériel jaugé contrôlé, la confection de la solution-étalon n'offre pas de difficulté. Enfin, en choisissant des tubes dont les bords s'appliquent exactement à la plaque de verre et en prenant soin de recueillir la totalité du gel renfermant la vanilline, nous avons toujours obtenu des résultats dont l'écart maximum avec la droite idéale était de ± 5 à 7 %. Cette précision est au moins égale à celle des autres méthodes si on considère que ces dernières ne sont nullement spécifiques et présentent de multiples causes de pertes.

Rapidité : Notre méthode permet facilement à un expérimentateur au courant de la chromatographie en couche mince et en possession d'une cuve et de plaques préparées à l'avance, d'effectuer *deux dosages complets en 1 h 45* environ. Le gain de temps est donc considérable par rapport à des techniques ou l'isolement seul de la vanilline nécessite au moins 2 à 24 heures. Avec deux cuves à chromatographie, on peut porter à quatre le nombre des dosages effectués dans le même temps puisque la durée de la migration et la centrifugation laissent à l'opérateur le loisir de s'occuper d'une seconde série.

Spécificité : L'indol donnant avec l'acide sulfurique concentré des colorations très voisines avec de nombreux autres aldéhydes, nous avons vérifié que leur présence, en plus de la vanilline, dans la tache de départ ne laissait pas une traînée invisible qui s'ajouterait malencontreusement à la coloration de la vanilline; pour cela, nous avons déposé des taches contenant toutes la même quantité de vanilline, soit seule, soit mélangée à d'autres aldéhydes aromatiques qui migrent plus loin qu'elle et pourraient se trouver dans les produits à expertiser. Or nous avons toujours obtenu le même résultat.

D'autre part, la présence de saccharose ne risque pas non plus d'intervenir puisque nous avons constaté qu'il migrait avec le front du solvant.

---

[5]) Pour nos mesures, nous avons utilisé le spectrophotomètre électronique Jobin-Yvon.

Seule l'isovanilline pourrait, à cause de sa proximité de la vanilline sur la plaque, perturber le dosage tel que nous l'avons décrit. Si sa présence était décelée, il faudrait réduire à 12 mm (au lieu de 20) la hauteur de la surface de gel à gratter. Mais ce composé constitue une fraude improbable puisqu'il n'existe pas dans la nature et que son prix de revient est nettement plus élevé que celui de la vanilline.

Nous considérons donc notre méthode comme *parfaitement spécifique* pour le dosage de la vanilline bien que la coloration utilisée ne le soit pas : le mérite en revient à l'excellent isolement de la vanilline et à sa localisation précise sous rayons ultraviolets.

Chapitre 3

EXTENSION DE LA MÉTHODE

Parallèlement et de la même façon, on peut obtenir à partir de la même plaque une coloration de l'indol avec de nombreux aldéhydes aromatiques voisins de la vanilline. Mais les acides correspondants, la coumarine et le vanitrope ne donnent rien. Afin de rendre la méthode utilisable pour une éventuelle détection des fraudes et leur dosage, nous avons pensé l'étendre plus particulièrement à l'*aldéhyde p-hydroxybenzoïque,* qui existe naturellement dans la vanille, ainsi qu'à l'*éthylvanilline,* au *pipéronal,* à l'*aldéhyde vératrique* et à l'*isovanilline,* qui peuvent donner des renseignements intéressants, les uns sur l'origine de la vanille, les autres sur sa falsification.

Dans les mêmes conditions qu'avec la vanilline, se développent des colorations rouges semblables avec tous les aldéhydes ci-dessus, sauf l'aldéhyde p-hydroxybenzoïque qui donne une coloration jaune-brun.

Pour chacun de ces composés, nous avons tracé le spectre d'absorption entre 400 et 600 mμ, vérifié la loi de Beer-Lambert au maximum d'absorption pour des concentrations allant jusqu'à 11 μg/ml et calculé le coefficient d'extinction de la combinaison correspondante avec l'indol.

Aldéhyde p-hydroxybenzoïque :

λ maximum : 480-490 mμ (ce qui correspond bien au changement de couleur observé)

ε à 490 mμ # 0,943 × 10^4

Ethylvanilline :

λ maximum : 510 mμ

ε à 510 mμ # 0,952 × 10^4

Pipéronal :

λ maximum : 510 mμ
ε à 510 mμ # $0{,}998 \times 10^4$

Aldéhyde vératrique :

λ maximum : 500 mμ
ε à 500 mμ # $1{,}019 \times 10^4$

Isovanilline :

λ maximum : 510 mμ
ε à 510 mμ # $0{,}989 \times 10^4$

Pour mieux les comparer, nous avons inscrit sur un même graphique, reproduit par la **figure 6,** les spectres de ces différents aldéhydes dont nous avons pris une quantité fixe égale à 11 μg et non pas une concentration moléculaire fixe : de cette façon, on se rend mieux compte des différences de densité optique fournie par une même concentration de chacun de ces aldéhydes.

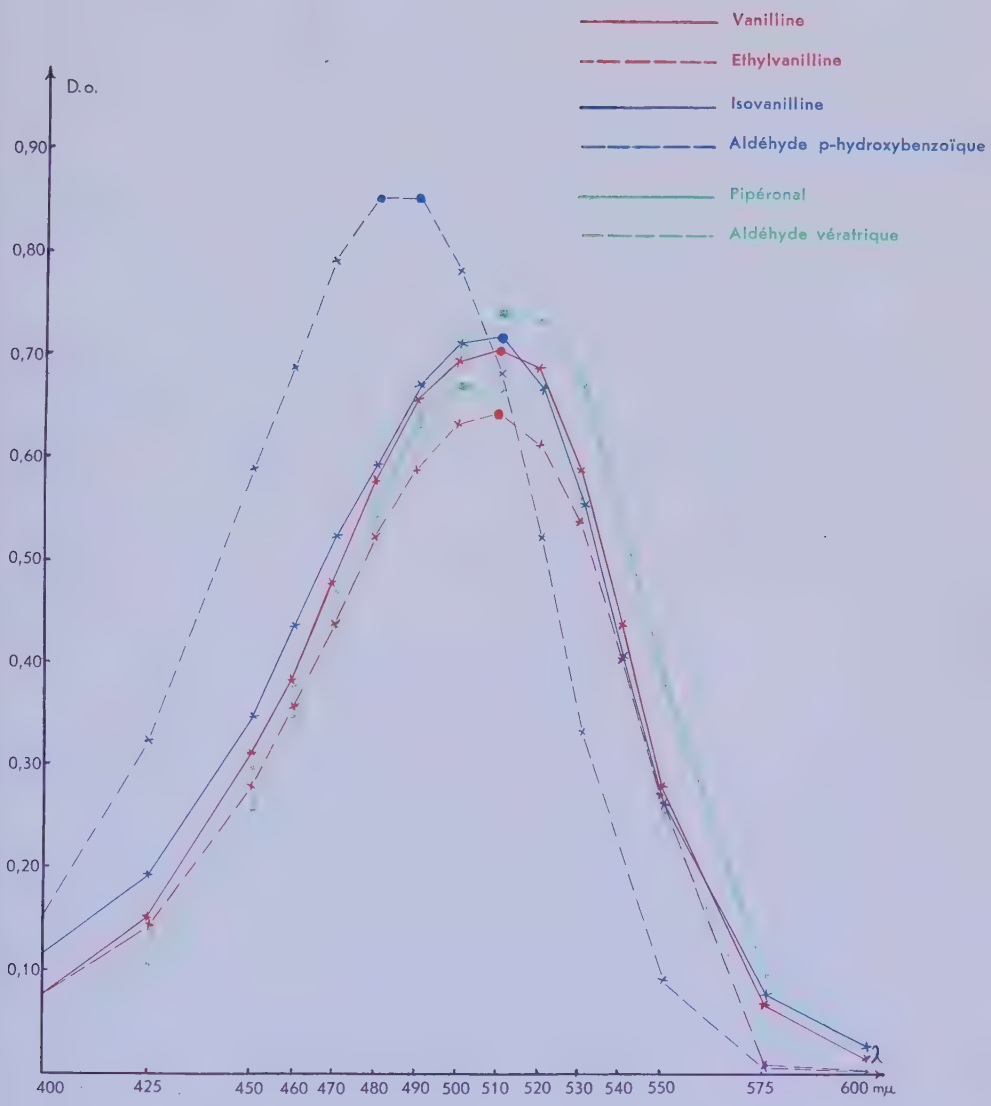


Fig. 6 - Spectres d'absorption des colorations de l'Indol avec divers Aldéhydes aromatiques.

Chapitre 4

APPLICATION A DIFFÉRENTS PRODUITS ALIMENTAIRES

La méthode que nous avons proposée pour rechercher et doser la vanilline et que nous avons étendue à divers aldéhydes aromatiques, naturels ou frauduleux, est applicable à n'importe quel produit vanillé ou vanilliné pourvu que soient remplies les deux conditions suivantes :

1) avoir en solution les composés qu'on recherche ou qu'on dose;

2) avoir déposé sur la plaque à chromatographie :
   environ 1 µg du composé recherché
   ou 1 à 5 µg du composé à doser.

Pour réaliser ces exigences, il faut le plus souvent effectuer des manipulations préliminaires. Mais on est handicapé par le fait que la vanilline est déjà sublimable à partir de 30° C [1]) et que l'évaporation de ses solutions sous vide partiel conduit également à des pertes importantes [2]). Nous éviterons donc de concentrer une solution de vanilline à chaud ou sous vide partiel. De plus, l'évaporation à température ordinaire est inemployable parce que trop longue; cela permet à la vanilline de se transformer en acide vanillique. Enfin, il s'avère pratiquement impossible de déposer convenablement plus de 100 µl sur la plaque de Kieselgel.

---

[1]) Garros-Patin (J.) Hahn (J.) dans Bouriquet (G.)
Encycl. biol., t. 46, Ed. Lechevalier, Paris (1954), p. 571.

[2]) Gnadinger (C.B.)
Effect of vacuum distillation on vanilla extract.
Journ. Ind. Eng. Chem. (1927), *19*, 342 - 344.

Nous tiendrons compte de ces différents impératifs et envisagerons comment obtenir et utiliser une solution-mère correcte à partir de :

A) liquides alcoolisés

B) produits liquides ou semi-fluides non alcoolisés

C) produits solides ou en poudre.

Mais de toute manière, sur une première plaque dite *plaque de recherche,* nous effectuons les recherches de la manière que nous allons exposer sous forme de fiche technique pour terminer. Si on veut ultérieurement doser la vanilline (ou un autre aldéhyde aromatique voisin), il est bon de déposer, déjà sur cette plaque de recherche, des volumes ou des dilutions de solution-mère variables afin de déterminer grossièrement, par comparaison avec une tache-étalon de 1 µg, quelle quantité sera nécessaire pour procéder au dosage.

FICHE TECHNIQUE DES RECHERCHES DANS LES PRODUITS VANILLÉS OU VANILLINÉS

Réactifs

— Toluène pur

— Solvants pour chromatographie en couche mince :

n° 1 :	benzène	95 ml
	méthanol	5 ml
n° 2 :	hexane	72 ml
	acétate d'éthyle	28 ml
n° 3 :	chloroforme	98 ml
	acétate d'éthyle	12 ml

Chacun ne peut servir que pour une migration.

— Solutions-témoins :

a) Mélange chloroformique des aldéhydes aromatiques :

vanilline		100 mg
éthylvanilline		100 mg
isovanilline		100 mg
aldéhyde vératrique		100 mg
aldéhyde anisique		100 mg
pipéronal		150 mg
chloroforme	q.s.p.	100 ml

— Conserver au frigidaire —

b) Mélange alcoolique des aldéhydes aromatiques :

ald. p-hydroxybenzoïque		100 mg
aldéhyde protocatéchique		100 mg
alcool à 90° G.L.	q.s.p.	100 ml

— Conserver au frigidaire —

c) Solution de coumarine :

coumarine		500 mg
chloroforme	q.s.p.	100 ml

— Conserver au frigidaire —

d) Solution de vanitrope :

vanitrope	150 mg
chloroforme	100 ml

— Conserver au frigidaire —

— Révélateurs :

a) pour les aldéhydes :

— benzidine chlorhydrique à 0,2 % dans l'acide chlorhydrique 2 N.

— sulfate d'hydrazine en solution saturée dans l'acide chlorhydrique 2 N.

b) pour les phénols :

— Solution A :

acide p-sulfanilique		0,20 g
acide chlorhydrique	concentré	10 ml
eau distillée	q.s.p.	100 ml

— Solution B :

nitrite de sodium		0,20 g
eau distillée	q.s.p.	100 ml

Mélanger extemporanément les solutions A et B à parties égales en évitant qu'elles ne s'échauffent.

La solution A se conserve bien, mais la solution B doit être refaite tous les jours.

c) pour la coumarine :

— solution alcoolique de soude

— Conserver bien bouché —

Obtention de la solution-mère

A) Cas des liquides alcoolisés :

Entrent dans cette catégorie : les *extraits* de vanille à différents degrés alcooliques; les « *essences* » de vanille; la *teinture*

de vanille officinale, de nombreux *parfums* dans lesquels un extrait de vanille sert de fixateur à d'autres produits plus odorants; divers *vins, apéritifs, liqueurs* et *« essences » pour liqueurs.*
Il faut distinguer deux possibilités :

1) *La teneur en vanilline est égale ou supérieure à 1 g/l :*

On effectue les recherches en prenant le *liquide pur* dont on dépose 1 à 5 µl. Si un *dosage* doit suivre, une *dilution* s'impose afin de mieux mesurer le volume à déposer sur la plaque. Cette dilution se fera, si possible, avec le même solvant, ou, à défaut, avec de l'alcool à 50°G.L. Les essais préliminaires sur la plaque de recherches avec des *dilutions croissantes* indiqueront laquelle est à retenir pour un dosage correct.

2) *La teneur en vanilline est inférieure à 1 g/l :*

Dans ce cas, nous déposons à côté de 1 µg de vanilline-témoin, des quantités croissantes de liquide pur jusqu'à 100 µl. Dans ces conditions, la limite de détection des aldéhydes recherchés, soit avec la benzidine chlorhydrique et les ultra-violets comme révélateurs, soit avec le sulfate d'hydrazine et les ultra-violets, sera de 1 mg/l environ, sauf pour le pipéronal dont le taux-limite sera de 1,5 à 2 mg/l.

B) Cas des produits liquides ou semi-fluides non alcoolisés :

Ce groupe comprend les *jus de fruits* et autres *boissons non alcoolisées,* les *crèmes* et *glaces* à la vanille, les *yaourts* et les *crèmes de marrons* aromatisés à la vanille ou à la vanilline.

Avant tout, il convient de fluidifier et d'homogénéiser les produits trop consistants : pour cela, on ajoute le minimum d'eau. Puis, on procède à une *extraction* avec un solvant non miscible en quantité aussi réduite que possible. Nous utilisons le *toluène* parce qu'il dissout bien la vanilline; de plus, il est moins volatil que l'éther et le chloroforme, ce qui est important quand on veut procéder de façon quantitative pour doser la vanilline dans le liquide d'extraction. Mais le toluène s'évapore quand même assez vite sous courant d'air froid quand on le dépose sur plaque. Enfin, il dissout moins de produits colorés gênants que l'éther.

En général, cette catégorie de produits alimentaires ne renferment qu'assez peu de vanilline. Nous en prenons 10 ml et 1 à 2 ml de toluène que nous agitons 10 minutes dans un tube. On laisse décanter. Puis il est prudent de déposer sur la plaque de recherche des volumes suffisamment importants pour atteindre, sinon dépasser les limites de détection. En général, il faut 50 à 100 µl d'extrait toluénique ce qui permet d'arriver au taux-limite de 1 mg/l de vanilline; mais on diminuera le volume déposé si, après révélation, on obtient une trop grosse tache de vanilline.

La mise en évidence de l'aldéhyde p-hydroxybenzoïque est le plus souvent impossible puisque son taux normal dans la vanille est dix fois moindre que celui de la vanilline, et de plus, il est assez peu soluble dans le toluène.

La difficulté du dosage de la vanilline croît avec le volume d'extrait toluénique à déposer parce qu'il est délicat de le laisser écouler sans que le diamètre de la tache ne soit trop grand. Pour éviter cela, on a tendance à relever la micropipette pour interrompre l'écoulement; mais alors se produisent des pertes par évaporation du liquide sur les bords externes de la pipette.

Par ailleurs, l'extraction au toluène ne saurait être totale : en pratique, nous retrouvons 70 à 80 % de la vanilline dans le toluène. En cas de dosage, il sera donc indispensable pour connaître exactement l'efficacité de l'extraction, de faire parallèlement un dosage avec surcharge de vanilline.

C) Cas des produits solides ou en poudre :

Dans ce groupe figurent les *vanilles naturelles*, « *Picadura* » [3]) et « *Vanilla Fruit* » [4]); les *poudres de vanille*; les *sucres vanillés* et *vanillinés*; *les chocolats, bonbons, pains d'épices, gâteaux secs* et autres *produits de pâtisserie*; les *poudres pour crèmes, glaces* et *puddings* dont l'arôme est déclaré naturel ou artificiel; enfin *les oléorésines* [5]).

---

[3]) Ce sont des vanilles de trop petite taille, fendues ou mal venues, dont le traitement est plus rapide et moins soigné. On les appelle encore « cuta » ou « cut ».

[4]) Préparé par la Compana Vanillera Mexicana S.A.

[5]) Certaines oléorésines, bien que semi-fluides, peuvent être traitées comme les autres produits de cette catégorie ou être dissoutes dans l'éthanol et entrer dans la catégorie des liquides alcoolisés.

Si besoin, on coupe, on broie, on pulvérise ou on concasse le produit solide à expertiser. Puis on procède à une *extraction par le toluène.* Le chloroforme, l'alcool et l'éther conviendraient également, mais ce dernier solvant dissout des produits colorés gênants. Dans un tube, on pèse 1 à 2 g de produit pulvérulent sur lequel on verse 1 à 5 ml de toluène de manière à obtenir un surnageant d'au moins 2 à 3 mm de hauteur. Après avoir agité pendant 10 minutes, on laisse décanter pendant 5 autres minutes. Le liquide surnageant, même non limpide, constitue la solution-mère dont on dépose 10 à 100 µl sur la plaque de recherche.

En cas de dosage ultérieur de la vanilline, on effectue dans les mêmes conditions l'extraction des produits en poudre avec une surcharge connue de vanilline. La proportion de vanilline perdue indiquera l'efficacité de l'extraction telle qu'elle a été pratiquée : en moyenne, le toluène extrait dans ces conditions 80 à 90 %.

Dans tous les cas envisagés, nous avons donc obtenu une solution, dite *solution-mère,* des produits alimentaires à expertiser. Elle est constituée ou du liquide pur lui-même ou d'une dilution ou d'un liquide d'extraction. Quoi qu'il en soit, cette solution-mère sert, et pour les recherches, et pour le dosage éventuel de la vanilline ou d'un aldéhyde voisin. Or nous savons déjà comment réaliser ce dosage [6]). Nous exposerons maintenant comment effectuer les recherches également par chromatographie en couche mince.

Dépôt des taches

Sur une plaque de Kieselgel G (ou GF_{254}), préparée et activée comme indiqué au chapitre 1 de notre partie expérimentale, on dépose pour une recherche complète de gauche à droite :

— à 4 cm :

1 ou 2 µl du mélange chloroformique des aldéhydes; on sèche et on remet au même endroit 1 ou 2 µl du mélange alcoolique des aldéhydes;

---

[6]) Voir notre première fiche technique.

— de cm en cm, du 5e au 8e :

des quantités de solution-mère variables selon le produit alimentaire dont on est parti;

— au 10e cm :

1 à 2 µl de solution de vanitrope;

— aux 11e et 12e cm :

deux taches de solution-mère;

— au 14e cm :

1 à 2 µl de la solution de coumarine;

— aux 15e et 16e cm :

deux taches de solution-mère.

Migration

Pendant que les taches finissent de sécher, on mélange dans la cuve à chromatographie les constituants du solvant choisi. En général, nous utilisons le solvant n° 1. Les numéros 2 et 3 peuvent servir pour un contrôle, mais le n° 3 ne sépare pas du tout la vanilline de l'isovanilline.

On immerge le bord inférieur de la plaque et on arrête la migration quand le front du solvant est à 10 cm au-dessus de la ligne de départ, ce qui dure environ 25 à 30 minutes. On sèche.

Révélation

On pulvérise sur la partie gauche de la plaque un révélateur des aldéhydes, au milieu celui des phénols et à droite celui de la coumarine, en cachant chaque fois les portions de plaque qui ne portent pas les substances intéressées par le révélateur. Aux ultra-violets, la coumarine prend une fluorescence verte et la détection des aldéhydes est nettement améliorée.

On note quels sont les composés présents dans l'inconnu en se basant sur leur position par rapport aux témoins et sur leurs colorations et leurs fluorescences.

RÉSULTATS

Les **figures 7, 8** et **9** montrent l'allure des chromatogrammes avec les solvants n° 1, 2 et 3 et le **tableau 1** donne les différentes colorations avec les révélateurs employés. Quant aux R_F, ils sont réunis dans le **tableau 2.**

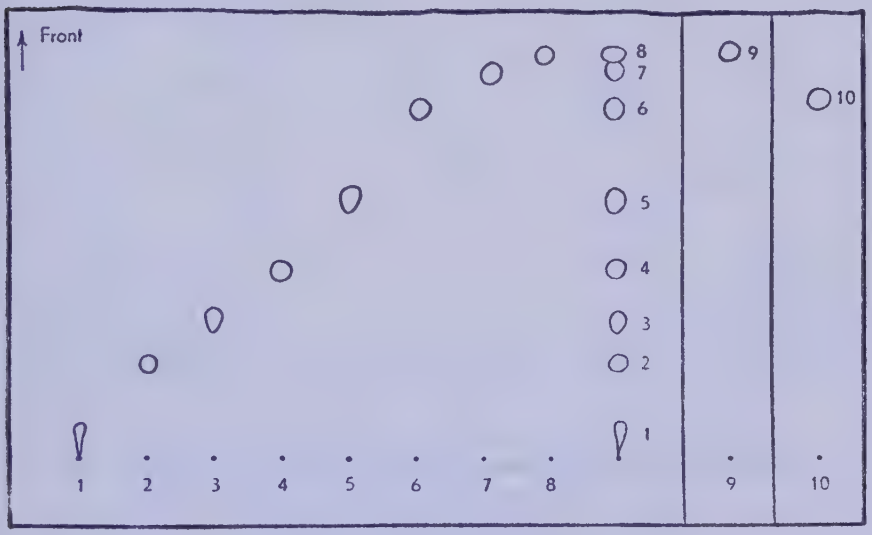


Fig. 7 - Chromatographie en couche mince sur Kieselgel G avec le solvant benzène / méthanol (95/5).

1 : Aldéhyde protocatéchique
2 : Aldéhyde p-hydroxybenzoïque
3 : Isovanilline
4 : Vanilline
5 : Ethylvanilline
6 : Aldéhyde vératrique
7 : Aldéhyde anisique
8 : Pipéronal
9 : Vanitrope
10 : Coumarine

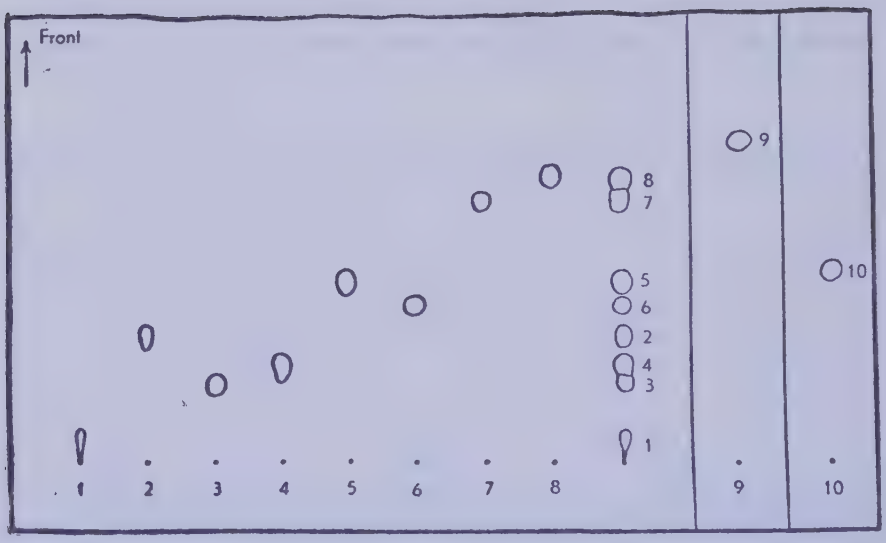


Fig. 8 - Chromatographie en couche mince sur Kieselgel G avec le solvant hexane/acétate d'éthyle (72/28)

1 : Aldéhyde protocatéchique
2 : Aldéhyde p-hydroxybenzoïque
3 : Isovanilline
4 : Vanilline
5 : Ethylvanilline
6 : Aldéhyde vératrique
7 : Aldéhyde anisique
8 : Pipéronal
9 : Vanitrope
10 : Coumarine

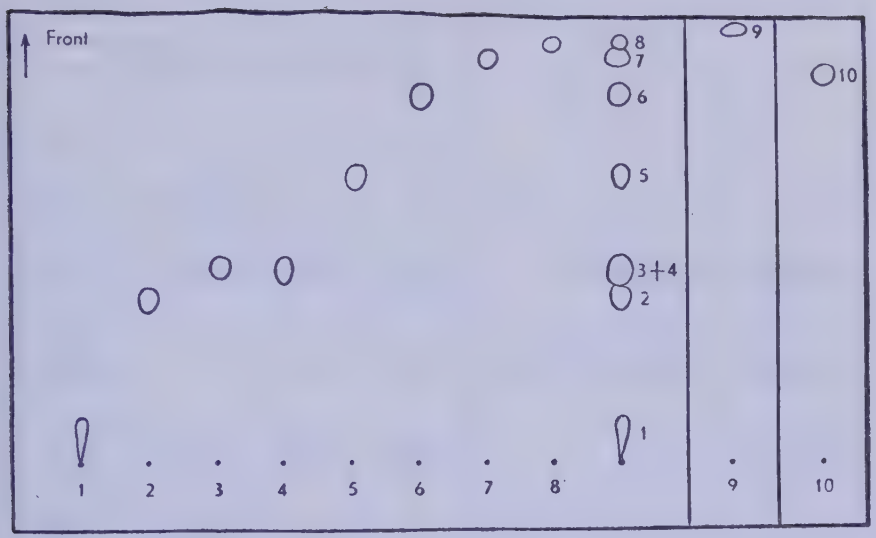


Fig. 9 - Chromatographie en couche mince sur Kieselgel G avec le solvant chloroforme /acétate d'éthyle (98/12)

1 : Aldéhyde protocatéchique
2 : Aldéhyde p-hydroxybenzoïque
3 : Isovanilline
4 : Vanilline
5 : Ethylvanilline
6 : Aldéhyde vératrique
7 : Aldéhyde anisique
8 : Pipéronal
9 : Vanitrope
10 : Coumarine

SUBSTANCES	Benzidine chlorhydrique		Sulfate d'hydrazine	
	sans U. V.	avec U. V.	sans U. V.	avec U. V.
Aldéhyde protocatéchique . .	**jaune orangé**	**jaune brun**	**jaune**	**brun**
Aldéhyde p–hydroxybenzoïque	**jaune**	**orangé**	**jaune**	**vert fluo-rescent**
Isovanilline	**jaune**	**jaune vert**	**jaune**	**brun**
Vanilline	**jaune**	**jaune vert**	**jaune à orangé**	**brun (reflets bleus)**
Ethylvanilline	**jaune**	**jaune vert**	**jaune**	**brun**
Aldéhyde vératrique	**jaune**	**jaune vert**	**jaune**	**jaune brun**
Aldéhyde anisique	**jaune**	**jaune vert**	**jaune**	**vert fluo-rescent**
Pipéronal	**jaune**	**jaune vert**	**jaune**	**brun à orangé**

Tableau 1 : Colorations obtenues selon les révélateurs

SUBSTANCES	SOLVANTS		
	1	2	3
Aldéhyde protocatéchique . .	**0,08**	**0,07**	**0,10**
Aldéhyde p–hydroxybenzoïque	**0,21**	**0,28**	**0,36**
Isovanilline	**0,31**	**0,17**	**0,43**
Vanilline	**0,42**	**0,21**	**0,43**
Ethylvanilline	**0,58**	**0,40**	**0,64**
Aldéhyde vératrique	**0,78**	**0,35**	**0,82**
Aldéhyde anisique	**0,86**	**0,58**	**0,90**
Pipéronal	**0,90**	**0,63**	**0,93**
Vanitrope	**0,91**	**0,71**	**0,97**
Coumarine	**0,80**	**0,47**	**0,86**

Tableau 2 : R_F obtenus sur Kieselgel G avec différents solvants :

1 = benzène / méthanol (95/5)

2 = hexane / acétate d'éthyle (72/28)

3 = chloroforme / acétate d'éthyle (98/12)

INTERPRÉTATION

Sont **naturels** dans Vanilla planifolia Andrews :

vanilline
aldéhyde p-hydroxybenzoïque
aldéhyde protocatéchique
acide vanillique
acide p-hydroxybenzoïque
acide protocatéchique

Sont **présents** dans Vanilla tahitensis Moore et dans V. pompona Schiede, mais absents dans V. planifolia Andrews (sauf à la Guadeloupe et à la Martinique) :

pipéronal
aldéhyde anisique
acide pipéronylique
acide anisique

Sont considérés comme **frauduleux** :

éthylvanilline (sauf dans les sucres dits vanillinés)
coumarine
vanitrope
pipéronal
aldéhyde anisique
aldéhyde vératrique
isovanilline

SUITE DE L'ANALYSE : Dosage de la vanilline

Si le dosage est demandé, il s'effectue après les recherches en se servant des indications fournies par cette plaque quant au volume de solution-mère à déposer. On opère comme indiqué dans notre première fiche technique [7]).

[7]) Voir le chapitre 2 de la deuxième partie.

CONCLUSION

Après avoir pris connaissance des méthodes anciennes et modernes, nous avons opté pour la chromatographie en couche mince pour isoler la vanilline et, dans ce domaine, nous avons choisi trois solvants qui séparent nettement la vanilline des aldéhydes aromatiques voisins qui existent dans la nature ou servent de fraude dans les produits alimentaires.

En particulier, le mélange benzène/méthanol (95/5 *v/v*) permet en plus de doser la vanilline après migration sur Kieselgel GF_{254}. Pour cela, on localise aux ultra-violets le composé à doser, on gratte soigneusement le gel qui le renferme et on procède à la détermination en utilisant la coloration rouge de la vanilline avec l'indol en milieu très acide. La lecture se fait au spectrophotomètre à 510 mμ après centrifugation du gel.

Puisque l'aldéhyde p-hydroxybenzoïque, habituel dans Vanilla planifolia Andrews, donne dans les mêmes conditions une coloration analogue, ainsi que l'éthylvanilline, le pipéronal et l'aldéhyde vératrique qui constituent des fraudes fréquentes dans les produits alimentaires, nous avons étudié les applications bromatologiques de cette méthode. Effectivement, elle convient, non seulement au dosage des aldéhydes aromatiques ci-dessus, mais aussi à la recherche simultanée d'autres falsifications telles que le vanitrope et la coumarine.

Par la combinaison de deux méthodes existantes que nous avons adaptées à nos besoins, nous pensons avoir mis au point une méthode de recherche et de dosage spécifique, assez simple et rapide de la vanilline et de ses principales adultérations du point de vue bromatologique.

Evidemment, notre méthode peut s'appliquer à la recherche et au dosage dans n'importe quel milieu biologique ou organique, pourvu qu'on ait la possibilité de déposer sur la plaque environ 1 μg du composé intéressant.

Pour la première fois donc, à notre connaissance, on est en possession d'un dosage parfaitement spécifique et facilement utilisable de la vanilline et de l'aldéhyde p-hydroxybenzoïque, mais il reste beaucoup à faire pour élucider la composition complète de la vanille. En effet, il serait souhaitable que l'expert connaisse et sache doser d'autres composés naturels à taux assez fixe afin de démasquer à coup sûr les fraudeurs qui diluent les produits vanillés et rajoutent de la vanilline synthétique en quantité calculée pour ne pas être en infraction.

Pour analyser la vanille, la répression des fraudes dispose donc d'une méthode particulièrement sûre; il y en aura d'autres assurément.

VU

Strasbourg, le 1er avril 1964

LE PRÉSIDENT DU JURY

M. HASSELMANN

VU et APPROUVÉ

Strasbourg, le 2 avril 1964

LE DOYEN de la FACULTÉ de PHARMACIE

G. GAZET DU CHATELIER

VU et PERMIS D'IMPRIMER

Strasbourg, le 10 avril 1964

LE RECTEUR de l'ACADÉMIE
PRÉSIDENT DU CONSEIL de l'UNIVERSITÉ

J. F. ANGELLOZ

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION 11

Première Partie

Etude bibliographique

I La Vanille

Chapitre 1 : Préparation de la vanille 19
» *2 :* Formation du parfum 23
» *3 :* Qualités et sortes commerciales de vanilles 27
» *4 :* Formes commerciales et utilisations de la vanille .. 35
» *5 :* Composition chimique de la vanille préparée 39
» *6 :* Principales fraudes 43
» *7 :* Analyses diverses 47

II La Vanilline

Chapitre 1 : Propriétés physico-chimiques de la vanilline 59
» *2 :* Propriétés physiologiques de la vanilline 67
» *3 :* Isolement de la vanilline 71
Extraction 71
Défécation 72
Electrophorèse 73
Chromatographie 74
» *4 :* Méthodes de dosage de la vanilline 87
Titrages volumétriques 87
Méthodes gravimétriques 89
Dosages colorimétriques 93
Méthodes potentiométriques 96

Méthodes polarographiques et oscillopolarographiques 97
Méthodes spectrophotométriques 98
Dosages des groupements fonctionnels de la vanilline 99
Dosages particuliers après chromatographie ou électrophorèse 100

Deuxième Partie

Partie expérimentale

Chapitre 1 : Séparation de la vanilline 105
» *2 :* Dosage de la vanilline 111
Fiche technique du dosage de la vanilline 122
» *3 :* Extension de la méthode 129
» *4 :* Application à différents produits alimentaires 131
Fiche technique des recherches dans les produits vanillés ou vanillinés 133

CONCLUSION 145

TABLE DES MATIÈRES 149

Dép. lég. IIe tr./64 - Impr. No 1104

IMPRIMERIE ALSATIA COLMAR
10, rue Bartholdi